



Instituto Politécnico de Coimbra
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra
Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Influência do polimorfismo no gene do receptor da FSH na forma
como as pacientes respondem ao tratamento de estimulação ovárica**

Liliana Casalinho dos Santos

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra
Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Influência do polimorfismo no gene do receptor da FSH na forma como as pacientes respondem ao tratamento de estimulação ovárica

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica de Ana Teresa Almeida Santos, Professora Doutora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e co-orientação de Ana Maria de Figueiredo Valado, Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública, Professora adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos, pela oportunidade de aprender, agradeço o ensinamento científico. Pelo espírito crítico com que me guiou.

Ao Serviço de Medicina da Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pela oportunidade de realizar o presente trabalho neste Serviço.

À Dra Silvana Fernandes, por prestar todo o apoio que lhe foi possível, fazendo todos os esforços para permitir que o trabalho fosse desenvolvido nas melhores condições.

À Paula, quero agradecer-te tudo o que fizeste por mim, pelo apoio, pela paciência e pelo tempo em que estiveste sempre disponível. Obrigada pela confiança que depositaste em mim.

Às técnicas do laboratório, Dra Ana Isabel, Dra Raquel Brito, Dra Fátima Veríssimo e Dra Conceição Dias pela alegria contagiante e ainda à Leonor por me ter facultado tantos processos.

À Ana Margarida, companheira de aventura desde o início do curso, pelas nossas conversas infinitas.

A todos os meus amigos, e em particular aos do serviço de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra por todo o apoio e por terem partilhado esta fase comigo.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou a seguir os meus sonhos, pelo amor e carinho incondicionais.

Ao Hugo, pela paciência, força e motivação em momentos de maior ansiedade, por me dares a mão sempre que preciso de coragem para avançar.

Júri

Professor Doutor Artur Augusto Paiva

Equiparado a professor adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Professor Doutor João Ramalho Santos

Professor associado da faculdade de ciências e tecnologia da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos

Professora auxiliar da faculdade de medicina da Universidade de Coimbra

Especialista Ana Maria de Figueiredo Valado

Professora adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Resumo

A estimulação da foliculogénese através da FSH é essencial para o êxito das técnicas de reprodução assistida. Variantes genéticas do receptor da FSH podem influenciar a resposta à estimulação ovárica em pacientes submetidas a estas técnicas. O polimorfismo Asn680Ser do exão 10 do gene do receptor da FSH tem sido implicado na variabilidade da resposta a esta hormona, podendo desempenhar um papel importante na estimulação ovárica controlada.

Verificou-se que no grupo das mulheres classificadas como más respondedoras, 44% apresentam o genótipo Ser/Ser, 38% Asn/Ser e 18% Asn/Asn. No grupo das pacientes com resposta normal e resposta elevada as frequências genótípicas foram, respectivamente, 10,3% e 14% para Ser/Ser, 51.5% e 50% para Asn/Ser, 38,2% e 36% para Asn/Asn. Entre as pacientes com genótipo Ser/Ser, 32,4% são más respondedoras, sendo esta frequência de 5,4% para o genótipo Asn/Asn e 8,2% para o genótipo Asn/Ser. No entanto, não se verificaram diferenças entre os três genótipos relativamente aos níveis de FSH basal, número de folículos recrutados, número de ovócitos obtidos após punção folicular e taxa de gravidez.

O genótipo parece ter influência na forma como as mulheres respondem ao processo de estimulação ovárica. As mulheres portadoras do genótipo Asn/Asn ou Asn/Ser apresentam baixa probabilidade de vir a desenvolver uma má resposta ovárica contrariamente às pacientes portadoras do genótipo Ser/Ser. Assim, o estudo do polimorfismo na posição 680 do exão 10 do gene do receptor da FSH poderá ser importante na previsão da resposta ovárica à estimulação com gonadotrofinas.

Palavras-chave

Polimorfismo Asn680Ser, resposta ovárica, FSH

Abstract

The stimulation of folliculogenesis by FSH is essential to the success of assisted reproduction techniques. Genetic variants of the FSH receptor may influence the response to ovarian stimulation in patients undergoing these techniques. The polymorphism Asn680Ser in exon 10 of the FSH receptor gene has been involved in the variability of the response to FSH and appears to have an important role in controlled ovarian hyperstimulation.

It was found that in the group of women classified as poor responders, 44% had a Ser/Ser genotype, 38% Asn/Ser and 18% Asn/Asn. In the group of normal responders and high responders the genotypic frequencies were, respectively, 10.3% and 14% for Ser/Ser, 51.5% and 50% for Asn/Ser, 38.2% and 36% for Asn/Asn. Among patients with Ser/Ser genotype, 32.4% were poor responders, and this frequency is 5.4% for Asn/Asn and 8.2% for Asn/Ser genotype. However, there were no differences between the three genotypes regarding other parameters such as basal FSH levels, number of recruited follicles, retrieved oocytes and pregnancy rates.

FSH receptor genotype seems to influence the response to controlled ovarian hyperstimulation. Women with Asn/Asn or Asn/Ser genotypes have low likelihood of developing a poor ovarian response, contrarely to women with Ser/Ser genotype. Thus, the study of the polymorphism at the position 680 in exon 10 of the FSH receptor gene could be important to predict ovarian response to gonadotropin stimulation.

Keywords

Asn680Ser polymorphism, ovarian response, FSH

Índice geral

Capítulo I – Introdução

1.1	Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.....	2
1.2.	Desenvolvimento folículo-ovocitário.....	4
1.2.1	Foliculogénese	4
1.2.2	Ovogénese.....	7
1.3	Ciclo menstrual	9
1.3.1.	Fase folicular	10
1.3.2.	Fase secretora	10
1.4.	Infertilidade e técnicas de reprodução assistida	12
1.5.	Resposta à estimulação ovárica	13
1.5.1.	Hormona folículo-estimulante.....	14
1.5.2.	Idade.....	15
1.5.3.	Hormona anti-Mülleriana	16
1.5.4.	Contagem de folículos antrais	17
1.6.	Síndrome de hiperestimulação ovárica.....	18
1.7.	Polimorfismo de nucleótido único do gene do receptor da hormona folículo-estimulante	19
1.8.	Objectivos	23

Capítulo II – Material e Métodos

2.1.	Descrição da população.....	25
2.2.	Doseamento Hormonal	25
2.3.	Protocolo de estimulação ovárica	26
2.4.	Genotipagem do polimorfismo Asn680Ser do receptor da FSH	27
2.4.1.	Extracção de ADN.....	27
2.4.2.	Quantificação de ADN.....	28
2.4.3.	Reacção de Polimerização em cadeia	28

2.4.4	Análise do polimorfismo de nucleótido único do gene do receptor da FSH através de enzimas de restrição	29
2.5.	Análise estatística	30

Capítulo III – Resultados

3.1.	Análise da população.....	32
3.2.	Identificação do genótipo do receptor da FSH	33
3.3.	Correlação dos diferentes genótipos do receptor da FSH com os parâmetros clínicos e biológicos	34
3.4.	Correlação dos diferentes tipos de resposta ovárica com os parâmetros clínicos e biológicos	35
3.5	Avaliação da resposta à estimulação ovárica com base no genótipo	37

Capítulo IV – Discussão

4.1.	Características clínicas e biológicas associadas ao genótipo.....	40
4.2.	Características clínicas e biológicas associadas à resposta ovárica	42
4.3.	Influência do genótipo na resposta ovárica	43

Capítulo V – Conclusão 46

Capítulo VI –Bibliografia 48

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal	3
Figura 2 - Estádios da foliculogénese a partir do desenvolvimento da célula primordial até à produção de um folículo pré-ovulatório.....	6
Figura 3 – Estádios da ovogénese e foliculogénese a partir do desenvolvimento da célula primordial	9
Figura 4 - Representação do ciclo ovárico, endometrial, bem como da variação dos níveis hormonais durante as diferentes fases do ciclo menstrual.....	11
Figura 5 - Representação esquemática da região codificante do receptor da FSH.....	20
Figura 6 – Análise do polimorfismo Asn680Ser do gene do receptor da FSH por PCR-RFLP	33
Figura 7 – Distribuição do estradiol no dia da hCG, tendo em conta a resposta à estimulação ovárica	36
Figura 8 – Distribuição da dose de FSH recombinante administrada, tendo em conta a resposta à estimulação ovárica.....	36

Índice de Tabelas

Tabela I - Condições de amplificação por PCR	29
Tabela II - Condições para enzima de restrição	29
Tabela III - Características clínicas e biológicas das pacientes submetidas a TRA, agrupadas de acordo com o polimorfismo do FSHR.....	34
Tabela IV - Características clínicas e biológicas das pacientes submetidas a TRA, agrupadas de acordo a resposta ao processo de estimulação ovárica	35
Tabela V - Análise dos diferentes genótipos do polimorfismo do receptor da FSH tendo em conta a resposta à estimulação ovárica	37
Tabela VI - Análise da resposta à estimulação ovárica com base no polimorfismo do receptor da FSH	38

Abreviaturas

ADN - ácido desoxirribonucleico

AMH - Hormona anti- Mülleriana

Asn - Aminoácido Asparagina

EDTA-K3 - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FSH - Hormona Folículo-estimulante

FSHR - Receptor da Hormona Folículo-estimulante

GnRH - Hormona libertadora de gonadotrofinas

hCG - Hormona Gonadotrofina Coriônica Humana

LH - Hormona Luteinizante

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Reacção de polimerização em cadeia)

RFLP - *Restriction fragment lenght polymorphism*

FSH_r - FSH recombinante

r.p.m. - Rotações por minuto

SHO - Síndrome de Hiperestimulação Ovária

SNP - *Single-Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Nucleótido Único)

Ser - Aminoácido Serina

TRA - Técnicas de Reprodução Assistida

UI - Unidades Internacionais

X² - Qui-quadrado

Capítulo I - Introdução

1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

A produção dos gametas femininos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que regula o desenvolvimento dos folículos do ovário e, consequentemente, a função reprodutiva. Sinais externos e internos são integrados no cérebro pelos neurónios neuroendócrinos do hipotálamo que produzem a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). A GnRH é secretada de forma pulsátil, sendo que as conexões do hipotálamo que regulam o padrão e amplitude dos pulsos de GnRH são moduladores e respondem a condições externas (psicológicas) e factores internos (metabólicos); (Berga and Naftolin 2012). A GnRH, transportada pelo sistema venoso porta hipofisário, actua sobre a hipófise anterior e estimula a síntese e secreção de gonadotrofinas: hormona luteinizante (LH) e hormona folículo-estimulante (FSH). Uma maior frequência de secreção pulsátil de GnRH estimula a síntese de LH, enquanto que menores frequências de secreção de GnRH favorecem a síntese de FSH (Knobil 1980; Dalkin, Haisenleder et al. 1989). As gonadotrofinas hipofisárias actuam sobre as gónadas a fim de regular a esteroidogénese (produção de hormonas esteróides) e a gametogénese (produção de gametas), desempenhando assim um papel fundamental no processo reprodutivo (Gharib, Wierman et al. 1990; Wuttke, Jarry et al. 1996; Berga and Naftolin 2012; Williams and Kriegsfeld 2012).

Por sua vez, as hormonas esteróides produzidas pelas gónadas são responsáveis pelos fenómenos de 'feedback' negativo e positivo, que irão modular a resposta da GnRH para a regulação de FSH e LH (Figura 1); (Shupnik 1996).

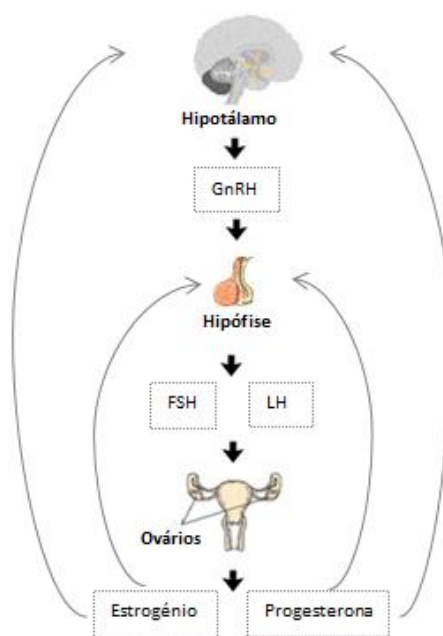


Figura 1 - Representação do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal (Adaptado de Wierman 2007)

Durante a maior parte do ciclo menstrual, o estradiol actua através de acções de ‘feedback’ negativo para reduzir a amplitude de secreção da GnRH, o que leva à inibição da secreção de LH hipofisária (Caraty, Locatelli et al. 1989; Moenter, Brand et al. 1992; Shupnik 1996). No entanto, quando a concentração sérica de estradiol diminui, ocorre o processo de ‘feedback’ positivo para a hipófise anterior, provocando um aumento da secreção da LH (atingindo o pico da LH) e, conseqüentemente, dá-se o processo de ovulação. Quando a quantidade de estradiol no sangue se torna muito baixa, dá-se o processo de ‘feedback’ positivo, estimulando a hipófise a produzir mais FSH e LH a fim de iniciar um novo ciclo menstrual (Shupnik 1996).

1.2. Desenvolvimento folículo-ovocitário

O processo de foliculogénese ocorre no ovário humano a partir da puberdade e tem como objectivo o desenvolvimento de um folículo dominante no interior do qual um ovócito atinge a maturidade, sendo libertado ciclicamente após o pico da LH (Almeida-Santos 2009).

1.2.1. Foliculogénese

A foliculogénese consiste na formação, crescimento e maturação folicular. A maturação do folículo depende da integração de mecanismos celulares e endócrinos que estão sobre o controlo das gonadotrofinas (van den Hurk and Zhao 2005). As gonadotrofinas estão envolvidas no processo de desenvolvimento e atresia folicular (Gibbons, Wiltbank et al. 1997).

O folículo primordial é constituído por um ovócito imaturo, circundado por uma camada de células da pré-granulosa (Hutt, McLaughlin et al. 2006). Os mecanismos que levam à passagem do folículo primordial a folículo primário permanecem desconhecidos. O folículo primário é constituído por um ovócito circundado por células da granulosa dispostas numa única camada (Lucci, Silva et al. 2001).

O folículo secundário está envolvido por duas ou mais camadas de células da granulosa (figura 2). Aquando da existência de três a seis camadas de células da teca, formadas a partir do estroma localizado em redor do folículo, mais células são recrutadas para formar a teca interna e externa, havendo circulação sanguínea entre estas camadas. Estas células desempenham um papel importante na produção hormonal (Ramalho-Santos 2012). Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro (Fauser and Van Heusden 1997). O líquido folicular é constituído por água, electrólitos, proteínas séricas e por uma elevada concentração de hormonas esteróides secretadas pelas células da granulosa (Barnett, Schilling et al. 2006). A partir deste estadio, os folículos passam a ser denominados folículos antrais. Durante a reorganização das células da granulosa para a formação do antro, algumas células dessa camada mobilizam-se originando um pequeno espessamento na parede do

folículo, denominadas células do *cumulus*, que servem de apoio para o ovócito (Ramalho-Santos 2012). Durante a fase antral, a maior parte dos folículos entram em degeneração por atresia, sendo que poucos deles alcançam a fase pré-ovulatória (Gougeon 1996; McGee and Hsueh 2000). A FSH não é necessária nas fases iniciais de proliferação e crescimento folicular, apesar das células dos pequenos folículos pré-antrais responderem ao estímulo desta hormona. No entanto, a segunda fase da foliculogénese é hormono-dependente (figura 2);(Almeida-Santos 2009).

Quando ocorre a diferenciação de células epiteliais na teca interna, o folículo passa a denominar-se por folículo pré-ovulatório (também denominado por folículo maduro ou folículo de Graaf) e o diâmetro folicular aumenta acentuadamente devido ao crescimento do ovócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento da cavidade antral. (Drummond and Findlay 1999; Parrott and Skinner 2000; Hickey, Marrocco et al. 2005). Apesar de vários folículos iniciarem este processo em cada ciclo menstrual, apenas um atinge a maturidade, sendo designado por folículo dominante e libertando o ovócito secundário contido no seu interior durante a ovulação. A dominância folicular é explicada pela aquisição mais rápida de receptores da LH e por uma amplificação da resposta à FSH resultante de um mecanismo autócrino (Almeida-Santos 2009).

O folículo dominante já sem ovócito sofre um processo de luteinização sobre a influência da LH, dando assim origem ao corpo lúteo. Devido à estimulação resultante do alto nível da LH libertada pela hipófise anterior, o corpo lúteo produz estradiol e progesterona (Snow 1996; Almeida-Santos 2009). Caso ocorra fertilização do ovócito, a progesterona desempenha um papel importante ao preparar a parede uterina para receber o embrião através da proliferação celular uterina (Ramalho-Santos 2012). Para além disso, aquando fertilização do ovócito, o corpo lúteo mantém a sua actividade devido à hormona gonadotrofina coriónica (hCG) produzida pela placenta. Após um período de cerca de três meses, o corpo lúteo degenera e a placenta passa a produzir progesterona e estrogénios (Snow 1996). Pelo contrário, caso não ocorra fertilização do ovócito, a actividade da hipófise é inibida devido ao elevado nível de progesterona no sangue produzida pelo corpo lúteo, verificando-se uma diminuição dos níveis de LH pelo mecanismo de 'feedback' negativo (figura 4). O corpo lúteo degenera dando origem ao *corpus albicans* (Gharib, Wierman et al. 1990; Berga and Naftolin 2012).

A diminuição da produção de esteróides pelo corpo lúteo leva a um aumento da FSH nos últimos dias do ciclo menstrual (Groome, Illingworth et al. 1996), isto é, o factor que leva ao aumento da FSH na fase lútea tardia prende-se com um aumento da secreção pulsátil

de GnRH, resultante de uma diminuição dos níveis de estradiol e de progesterona (Welt, Pagan et al. 2003). Este aumento da FSH permite o recrutamento de folículos no ovário. Além disso, o aumento dos níveis de FSH durante a fase lútea tardia leva a um aumento da secreção de estradiol por parte das células da granulosa (Amsterdam and Rotmensch 1987).

Após a menstruação, os níveis da FSH entram em declínio devido ao 'feedback' negativo do estradiol (Groome, Illingworth et al. 1996; Welt, Martin et al. 1997). As células da teca interna produzem androstenediona, que irá ser transportada para as células da granulosa. Sob a influência da FSH, as células da granulosa sintetizam uma enzima, aromatase, que transforma a androstenediona em estradiol (Drummond 2006). Esse processo leva a uma diminuição da produção da FSH, impedindo o desenvolvimento de outros folículos e, conseqüentemente, revela-se crucial para a selecção do folículo dominante (van Santbrink, Hop et al. 1995). Também as células da granulosa de folículos em crescimento secretam uma variedade de peptídeos que podem interferir na regulação autócrina ou parácrina na inibição do desenvolvimento dos folículos adjacentes (Durlinger, Kramer et al. 1999).

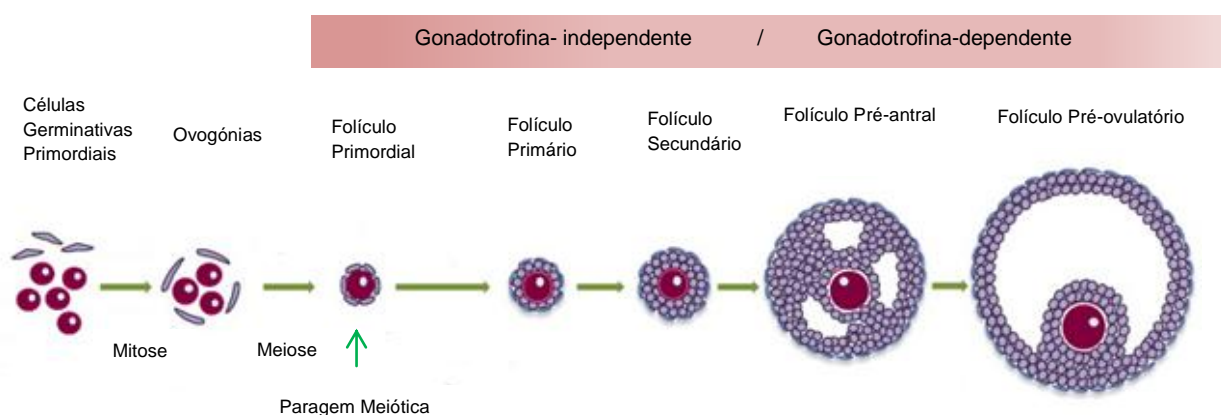


Figura 2 - Estádios da foliculogénese a partir do desenvolvimento da célula primordial até à produção de um folículo pré-ovulatório (Adaptado de Sanchez and Smitz 2012).

1.2.2. Ovogénese

A ovogénese inicia-se durante a vida embrionária com a formação das células germinativas primordiais no epiblasto embrionário. Estas células migram para os sulcos genitais onde se diferenciam, dependendo dos cromossomas sexuais, em ovogónias ou espermatogónias, que mostram uma alta frequência de actividade mitótica e de transcrição (Gosden and Bownes 1995; Gosden, Krapez et al. 1997; Picton, Briggs et al. 1998). No ovário, as divisões mitóticas das células primordiais resultam na formação de grupos de ovogónias (figura 2), que se encontram interligados por ligações intercelulares citoplasmáticas. Formam-se assim aglomerados de células germinativas (Sawyer, Smith et al. 2002).

As ovogónias passam pelos estadios iniciais da profase I meiótica (leptóteno para paquíteno), formando-se assim os ovócitos primordiais (Guraya 1998; Picton, Briggs et al. 1998). O tamanho das células germinativas aumenta à medida que o ovócito progride para o estadio de diplóteno. O ovócito fica envolvido por uma camada de células de pré-granulosa, dando assim origem ao folículo primário (Gosden and Bownes 1995). Estas células foliculares que rodeiam o ovócito produzem um polipeptídeo de baixo peso molecular que tem a capacidade de inibir a meiose. Sendo assim, a meiose fica parada na profase I, na fase de diplóteno, em que os ovócitos primários, ainda diplóides, permanecem nesta fase até à puberdade (Picton, Briggs et al. 1998).

Verifica-se a ocorrência de mudanças importantes no núcleo do ovócito devido ao processo meiótico (Fauser, Devroey et al. 1999). Para além disso, no citoplasma, as mitocôndrias tornam-se mais numerosas e localizam-se ao longo da superfície externa da membrana nuclear (Ramalho-Santos, Varum et al. 2009). O complexo de Golgi está presente também junto ao núcleo, em volta dos centríolos. Acredita-se que esta polarização nuclear dos organelos é necessária para o metabolismo do ovócito, sendo que nesta fase inicial depende da actividade microtubular (Motta, Nottola et al. 1995). Por outro lado, também nesta fase inicial da meiose, quando as proteínas reparadoras de ADN e vários outros factores são necessários para o adequado alinhamento e recombinação de cromossomas, os ovócitos são extremamente vulneráveis, resultando num processo de degeneração de muitos deles (Picton, Briggs et al. 1998).

Após o nascimento, estão presentes no ovário cerca de 1 milhão de ovócitos primários. Este número diminui durante a infância, resultando num pool de folículos primordiais de

300 000-500 000 folículos na menarca (Faddy, Gosden et al. 1992). No entanto, apenas um número reduzido destes ovócitos irão ser ovulados durante a vida reprodutiva da mulher, sendo que a maioria irá sofrer um processo de degeneração, ou seja, a maioria dos folículos que entram em crescimento irá degenerar como resultado de atresia, caso não sejam recrutados pela FSH (Motta, Nottola et al. 1995). Este recrutamento pela FSH inicia-se após a puberdade com o início dos ciclos ovários, quando o eixo hipófise-gonadal for activado (McGee and Hsueh 2000). O ovócito pode ficar retido na profase I até ao folículo degenerar ou até este último entrar em maturação sob acção de LH, que induz o ovócito a retomar a meiose (Byskov and Hoyer 1988). Em cada ciclo ovário normalmente só um ovócito primário completa a primeira divisão meiótica. Durante a telófase, o citoplasma do ovócito divide-se de forma desigual dando origem a duas células haplóides de tamanhos diferentes: o ovócito secundário, que apresenta tamanho semelhante à célula-mãe, e o primeiro globo polar, que apresenta um tamanho reduzido pois, apesar de apresentar o mesmo número de cromossomas, possui uma quantidade mínima de citoplasma (Verlinsky, Ginsberg et al. 1990; Ramalho-Santos 2012). O ovócito secundário encontra-se envolvido por uma camada extracelular glicoproteica, denominada zona pelúcida (Rankin and Dean 2000) que tem como função a protecção do ovócito secundário e o reconhecimento dos gâmetas masculinos (Ramalho-Santos 2012).

O ovócito secundário entra na segunda divisão meiótica, ficando retido em metafase II. Neste momento ocorre a ovulação, em que o folículo maduro rompe e o ovócito secundário é libertado para as trompas uterinas. Dos vários ovócitos secundários que se desenvolvem no ovário durante o ciclo menstrual, apenas um irá ser libertado durante a ovulação, ao passo que os restantes irão degenerar (Ramalho-Santos 2012). O processo meiótico finda com a fecundação, originando uma célula de maiores dimensões, o ovúlo, e uma célula mais pequena, o segundo globo polar, que irá degenerar (figura 3); (Motta, Nottola et al. 1995). Este processo continua ao longo da vida até que o pool de folículos primordiais esteja esgotado, surgindo assim a menopausa. (Richardson, Senikas et al. 1987; McGee and Hsueh 2000).

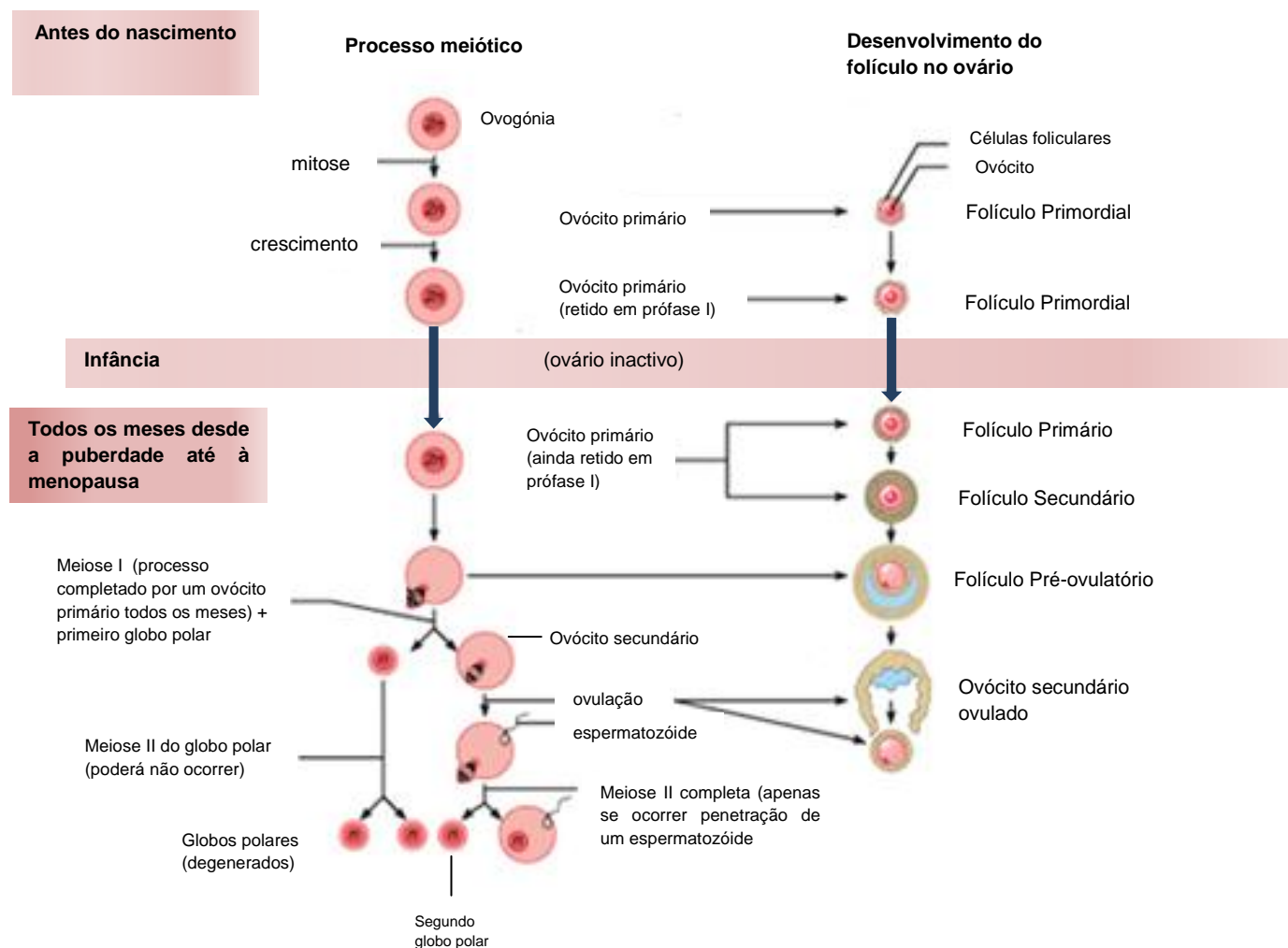


Figura 3 – Estádios da ovogénese e foliculogénese a partir do desenvolvimento da célula primordial.

1.3. Ciclo menstrual

Um ciclo menstrual normal tem uma duração de cerca de 28 dias e é constituído por duas fases: a fase folicular e a fase secretora (também designada como fase lútea). O ciclo menstrual começa no primeiro dia da hemorragia menstrual de um ciclo e dura até ao início da menstruação do ciclo seguinte. O período ovulatório, que ocorre cerca de catorze dias após o início da menstruação, marca a transição da fase folicular para a fase lútea (Figura 4); (Vollman 1977).

1.3.1. Fase folicular

A fase folicular, também denominada por fase proliferativa, começa no primeiro dia da menstruação e ocorre até ao período da ovulação. Nesta fase, as células do estroma, as células epiteliais e as glândulas uterinas começam a proliferar rapidamente. Para além disso, as artérias começam a crescer de modo a ocorrer um espessamento do endométrio. Esta fase caracteriza-se pelo desenvolvimento dos folículos ovários e pela presença de temperaturas corporais mais baixas (Vander, Sherman et al. 1990).

Durante a fase folicular, os níveis séricos de estradiol aumentam com o aumento do tamanho do folículo (figura 4). Como se verifica um aumento de células da granulosa, também aumenta o número de receptores da FSH que se encontram exclusivamente nas membranas destas células. Na presença de estradiol, a FSH estimula a formação de receptores de LH em células da granulosa que permitem a secreção de pequenas quantidades de progesterona. A progesterona pode exercer um 'feedback' positivo sobre o estradiol levando a hipófise a aumentar a secreção da LH, a qual irá induzir a ovulação. A ovulação refere-se ao processo de libertação do ovócito maduro do folículo. Vários estudos demonstram que a libertação do ovócito é um processo activo que envolve a contracção do músculo liso da parede do folículo. Aquando da ovulação, o endométrio apresenta aproximadamente 12 milímetros de espessura. Neste momento da fase folicular, as glândulas endometriais secretam um muco fino e fibroso, que tem como função proteger e conduzir o espermatozóide no útero (Shupnik 1996; Guraya 1998).

1.3.2. Fase secretora

É na fase secretora que o folículo dominante já sem ovócito degenera em corpo lúteo. Caso não ocorra fertilização do ovócito, o corpo lúteo começa a degenerar por volta do 23º dia do ciclo menstrual devido aos níveis reduzidos de LH. Consequentemente, a produção de estradiol e progesterona também diminui (Gharib, Wierman et al. 1990; Berga and Naftolin 2012). Simultaneamente, prossegue o aumento de espessura do endométrio, bem como a actividade secretora das glândulas nele existentes, que secretam nutrientes na cavidade uterina, devido à acção conjunta do estradiol e da

progesterona produzidos durante esta fase (Byskov and Hoyer 1988). Os vasos sanguíneos presentes no endométrio entram em constrição como resultado da falta de estimulação por parte das hormonas ováricas. Consequentemente, as células endometriais entram em hipóxia, deixando também de ter aporte de nutrientes. Isto resulta num processo de descamação das células endometriais. Dá-se então a fase menstrual (Vander, Sherman et al. 1990).

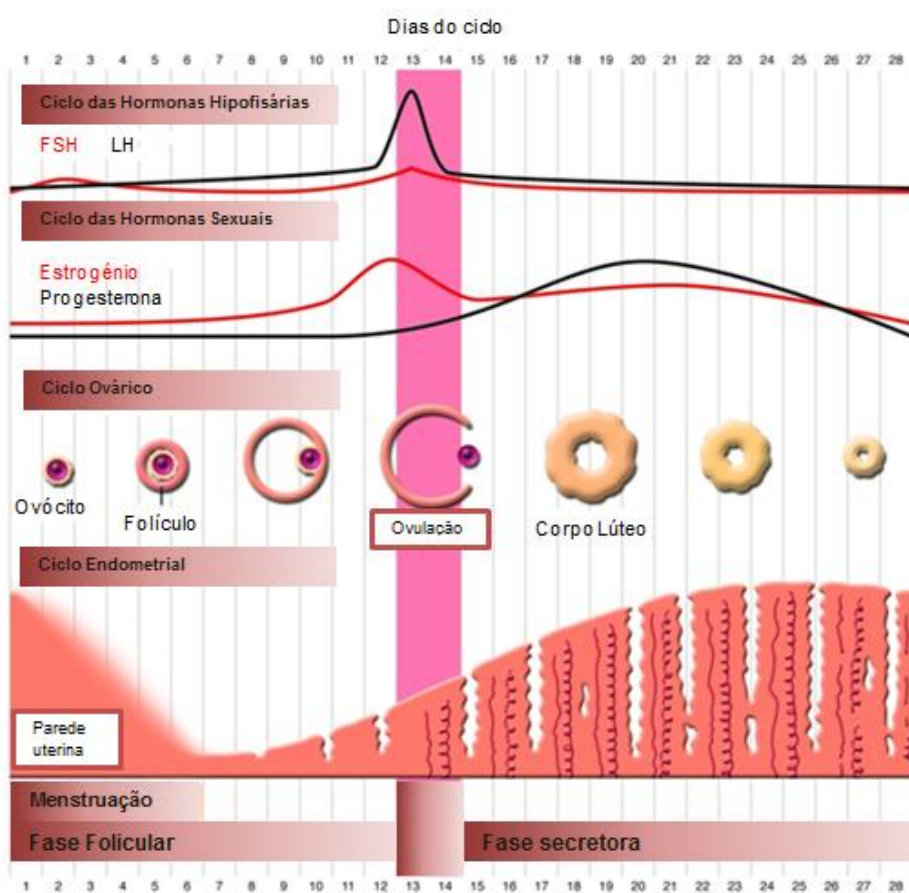


Figura 4 - Representação do ciclo ovárico, endometrial, bem como da variação dos níveis hormonais durante as diferentes fases do ciclo menstrual (Adaptado de Aitken, Baker et al. 2008).

1.4. Infertilidade e técnicas de reprodução assistida

A infertilidade humana define-se como a ausência de procriação ao fim de um ano de vida sexual contínua, sem métodos contraceptivos (Evers 2002). Este problema afecta cerca de 10 a 15% de casais em todo o mundo (Evers 2002; Gnoth, Godehardt et al. 2005).

Mudanças sociais e comportamentais no último trimestre do século XX podem ter afectado a taxa de infertilidade, embora não esteja claro se a prevalência da infertilidade mudou ao longo do tempo (Macaluso, Wright-Schnapp et al. 2008). Em resultado destas mudanças, a procriação medicamente assistida tem vindo, nos últimos anos, a ganhar maior ênfase para os casais com desejo de ter filhos (Poncelet and Sifer 2011), principalmente entre as mulheres com idade mais avançada (Roupa, Polikandrioti et al. 2009).

As principais causas de infertilidade na mulher prendem-se com problemas de origem tubar, uterina, cervical, ovárica ou endócrina (Roupa, Polikandrioti et al. 2009), sendo que 50% dos casos de infertilidade na mulher estão relacionados com problemas ovulatórios e tubários (Seshagiri 2001).

Recorre-se às técnicas de reprodução assistida (TRA) a fim de ultrapassar algumas situações de infertilidade. A grande maioria destas técnicas envolve a punção directa de ovócitos, após estimulação ovárica, combinando espermatozóides e ovócitos no laboratório, com posterior implantação do embrião no útero. A fertilização do ovócito ocorre através da co-incubação de espermatozóides e ovócitos (*Fertilização in vitro* clássica) ou através de injeção directa de um único espermatozóide no citoplasma do ovócito sob visualização microscópica (injeção intracitoplasmática de um espermatozóide). Esta última é particularmente eficaz para casais com problemas de infertilidade de origem masculina (baixa contagem de espermatozóides no ejaculado); (Voorhis 2007). A inseminação intra-uterina, também denominada por inseminação artificial, consiste na recolha e selecção de espermatozóides e sua posterior deposição na cavidade uterina durante a fase ovulatória da mulher (Nuojuu-Huttunen, Tomas et al. 1999).

1.5. Resposta à estimulação ovárica

A má resposta ovárica perante a estimulação ovárica controlada foi descrita pela primeira vez em 1983 por Garcia et al. como estando associado a níveis séricos de estradiol inferiores a 300 pg/mL, a uma diminuição do número de ovócitos recolhidos e fertilizados e de embriões transferidos (Garcia, Jones et al. 1983)

Existe grande vantagem em identificar as mulheres em risco de desenvolver uma má resposta ovárica antes de dar início aos tratamentos de fertilização. As TRA são técnicas dispendiosas e invasiva, pelo que não devem ser realizadas se não houver hipótese de sucesso (Arslan, Bocca et al. 2005).

A sociedade Europeia da Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) estabeleceu um consenso (consenso de Bolonha) no que diz respeito aos critérios necessários para classificar a má resposta ovárica (Ferraretti, La Marca et al. 2011). Até então, e apesar da evidência da falta de uma definição universal e da reconhecida necessidade de padronização, os estudos adoptavam critérios diferentes para selecção das pacientes para os ensaios clínicos.

Segundo os critérios de Bolonha, para uma mulher ser considerada má respondedora tem de ter presentes pelo menos dois dos seguintes critérios:

- ter idade avançada (superior a 40 anos de idade)
- ter um episódio prévio de má resposta ovárica (menos de 4 ovócitos com um protocolo de estimulação convencional)
- ter um teste de reserva ovárica anormal (contagem de folículos antrais inferior a 5 folículos ou hormona anti- Mülleriana (AMH) inferior a 0,5 ng/mL).

Dois episódios de má resposta ovárica são suficientes para classificar a paciente como má respondedora (Ferraretti, La Marca et al. 2011).

De entre as pacientes submetidas a TRA, a prevalência de más respondedoras varia entre os 9% e 24% (Keay, Liversedge et al. 1997). Para além do significado preditivo para a ocorrência de gravidez após TRA, a previsão de má resposta ovárica também é potencialmente importante para o ajuste individual da dose de gonadotrofinas antes da estimulação ovárica. Segundo Popovic-Todorovic et. al., as mulheres com uma má

resposta esperada necessitam de uma dose inicial de 225 UI/dia, em vez de 150 UI/dia (Popovic-Todorovic, Loft et al. 2003). A principal causa de insucesso das TRA nas más respondedoras prende-se com a diminuição do número de ovócitos obtidos bem como com a diminuição da qualidade dos mesmos (Kucuk, Kozinoglu et al. 2008).

Factores que avaliam a reserva ovárica

Embora a medição directa do pool de folículos primordiais seja impossível, tem sido demonstrado que o número de folículos nos ovários está proporcionalmente relacionado com o tamanho da reserva de folículos primordiais (Gougeon, Ecochard et al. 1994).

Como referido anteriormente, os processos de foliculogénese e ovogénese continuam ao longo da vida até que o pool de folículos primordiais esteja esgotado, surgindo assim a menopausa. Os anos que precedem a menopausa são caracterizados por uma diminuição da fertilidade e os ciclos menstruais tornam-se irregulares. Na tentativa de se avaliar a reserva ovárica foram propostos diversos testes, entre os quais a quantificação da FSH, estradiol, AMH e contagem de folículos antrais. O sucesso da indução da ovulação e das TRA diminui com a diminuição da reserva ovárica (Richardson, Senikas et al. 1987; McGee and Hsueh 2000).

1.5.1. Hormona Folículo-estimulante

A quantificação da FSH no terceiro dia do ciclo menstrual é o método mais utilizado para avaliação da reserva ovárica por ser facilmente mensurável, minimamente invasivo, barato e apresentar bom valor preditivo (Gurgan, Urman et al. 1997). Os níveis da FSH na fase folicular aumentam com o avançar da idade. Este aumento encontra-se associado a uma redução dos níveis da inibina B ovárica pela diminuição da carga folicular. O mecanismo envolve o sistema de 'feedback' do ovário sobre a hipófise, sendo indicadora da reserva ovárica. Caso a quantificação da FSH seja elevada, há grande probabilidade de se estar perante uma má respondedora por diminuição da reserva ovárica, podendo-se aconselhar a paciente a não realizar os ciclos de estimulação ovárica (Broekmans, Scheffer et al. 1998). O valor de FSH basal apresenta uma variabilidade intra-individual de ciclo para ciclo (Tinkanen, Blauer et al. 1999).

Segundo *Aubriot e Chapron*, quando a FSH é elevada, a taxa de gravidez nas mulheres jovens é considerada razoável (30%), sendo consideravelmente mais baixa nas mulheres com idade mais avançada (16%);(Aubriot and Chapron 2008).

A quantificação de estradiol basal também pode ser um marcador da diminuição da reserva ovárica em mulheres com idades mais avançadas, nas quais se verifica um aumento de concentração desta hormona. Níveis elevados de estradiol, na presença de níveis de FSH aparentemente normais, resultam de um recrutamento folicular prematuro que ocorre em consequência de um aumento prematuro de FSH luteal (Licciardi, Liu et al. 1995).

1.5.2. Idade

A fertilidade diminui drasticamente a partir da quarta década de vida da mulher devido à diminuição da reserva ovárica com o passar da idade ou à diminuição da qualidade dos ovócitos (Lesser 1999; Liu and Case 2011). Vários estudos mostram que a má resposta ovárica é o primeiro sinal da idade ovárica (Beckers, Macklon et al. 2002; Nikolaou, Lavery et al. 2002). As taxas de sucesso das TRA sofrem uma acentuada redução quando a idade da mulher ultrapassa os 35 anos. Com o avançar da idade da mulher verifica-se uma diminuição do número de folículos pré-ovulatórios, bem como o valor médio de estradiol por folículo pré-ovulatório apresenta um ligeiro decréscimo (Jacobs, Metzger et al. 1990). Os ovócitos de mulheres mais velhas podem ser mais propensos a sofrer de não-disjunção na primeira divisão meiótica e de degeneração cromossómica. Foi também descrito que os ovócitos de mulheres mais velhas são mais propensos a terem deleções no ADN mitocondrial quando comparados com ovócitos de mulheres mais jovens. Estes podem ser o motivo pelo qual os folículos de mulheres com idade mais avançada se encontram muitas vezes mais imaturos ou em fase de degeneração quando comparados com os folículos de mulheres mais jovens (Keefe, Niven-Fairchild et al. 1995; Lim and Tsakok 1997; van Zonneveld, Scheffer et al. 2003). Sendo assim, a idade materna é um critério clínico que poderá levar a um rastreio pré-natal mais rigoroso a fim de detectar precocemente eventuais deficiências cromossómicas no feto (Ramalho-Santos 2012). A idade ovárica reflecte-se na diminuição da capacidade de resposta à administração de gonadotrofinas exógenas e, consequentemente, resulta numa diminuição da taxa de gravidez (van Rooij, Broekmans et al. 2005).

Segundo Hendriks et al., a taxa de gravidez no 2º e 3º ciclo de estimulação ovárica em mulheres que tiveram uma má resposta no primeiro ciclo é de aproximadamente 24% para mulheres com idade próxima dos 30 anos e de 14% para mulheres com 40 anos. Em mulheres classificadas como más respondedoras as taxas de gravidez são de 12% e 6% em mulheres de 30 e 40 anos, respectivamente. Sendo assim, a idade, quando analisada como factor isolado, não fornece informação sobre a forma como a mulher irá responder à estimulação (Hendriks, te Velde et al. 2008).

1.5.3. Hormona anti-Mülleriana

A Hormona anti- Mülleriana (AMH) é uma glicoproteína dimérica que pertence à família do factor de crescimento transformante beta (TGF- β). A AMH é secretada pelas células da granulosa após a puberdade e controla o desenvolvimento dos folículos primários (via parácrina e autócrina) pela inibição do recrutamento de mais folículos durante a foliculogénese (Carlsson, Scott et al. 2006; Visser, de Jong et al. 2006). Esta hormona é fracamente expressa nos folículos primários, aumentando a sua expressão para valores máximos em folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais. A sua expressão diminui gradualmente à medida que os folículos aumentam de tamanho até ser indetectável. A AMH não se expressa em folículos com ovócitos atresicos (Weenen, Laven et al. 2004). Por esse motivo, existe uma forte associação entre os níveis séricos de AMH e a reserva ovárica (Anckaert, Smits et al. 2012).

Existem vários parâmetros que reflectem a reserva folicular, tais como os seguintes marcadores bioquímicos: níveis séricos de FSH basal, estradiol, inibina B. No entanto estes marcadores variam ao longo do ciclo menstrual, sendo por isso limitada a avaliação da reserva ovárica com base nestes valores (Al-Azemi, Killick et al. 2011; Gleicher, Weghofer et al. 2011). A AMH é considerada o melhor marcador sérico da reserva ovárica, tanto pelo facto de poder ser quantificada em qualquer altura do ciclo menstrual, como pelo facto de ser o marcador endócrino mais precoce de idade ovárica (de Vet, Laven et al. 2002; Seifer and Maclaughlin 2007; Al-Azemi, Killick et al. 2010).

As pacientes classificadas como más respondedoras apresentam níveis de AMH significativamente mais baixos quando comparadas com as pacientes com resposta normal (Haadsma, Bukman et al. 2007; Jayaprakasan, Campbell et al. 2010; Binder, Strick et al. 2012). Segundo um estudo de Leader et al., há uma grande discordância entre os valores de AMH e FSH em todos os grupos etários, sendo que esta diferença se

agrava com a idade (Leader, Hegde et al. 2012). Para além dos níveis de AMH significativamente mais baixos, as pacientes más respondedoras apresentam níveis de FSH mais elevados em relação às pacientes com resposta normal (Jayaprakasan, Campbell et al. 2010).

1.5.4. Contagem de folículos antrais

A contagem de folículos antrais, isto é, a contagem total do número de pequenos folículos antrais existentes antes da administração das gonadotrofinas, é considerado como factor de excelência para avaliar a reserva ovárica (Bancsi, Broekmans et al. 2002; Sills, Alper et al. 2009).

Ao contrário da AMH, a contagem de folículos antrais só pode ser avaliada no início da fase folicular (Broekmans, de Ziegler et al. 2010). Esta última é medida através de ecografia bidimensional e apresenta a vantagem de ser uma medida directa da população de folículos seleccionáveis para futura punção, ou seja, não se obtém apenas informação sobre o número de folículos presentes mas também sobre o tamanho dos mesmos. No entanto, a quantificação de AMH torna-se mais cómoda para a paciente uma vez que para a sua quantificação basta uma colheita de sangue venoso, que já faz parte da rotina das pacientes antes de iniciarem as TRA (Rombauts, Onwude et al. 2011). De entre todos os testes, a contagem de folículos antrais e a AMH têm a melhor sensibilidade e especificidade na predição da reserva ovárica. A análise destes dois parâmetros juntos torna-se desnecessária pois não se verifica um aumento das suas capacidades de prognóstico (Jayaprakasan, Campbell et al. 2010; La Marca, Sighinolfi et al. 2010).

1.6. Síndrome de hiperestimulação ovárica

A resposta do ovário à estimulação com gonadotrofinas varia de pessoa para pessoa, em que más respondedoras apresentam poucos folículos maduros, exigindo o reajuste da dose de FSH recombinante. Por outro lado, pacientes com resposta elevada apresentam maior risco de desenvolver síndrome da hiperestimulação ovárica (SHO); (HasanSheikhha, Eftekhari et al. 2011).

A SHO é uma grave complicação das TRA, potencialmente fatal, geralmente iatrogénica após a administração de gonadotrofinas. Caracteriza-se pelo aumento do volume dos ovários e extravasamento de líquido para a cavidade abdominal, resultando em ascite, hipovolémia e hemoconcentração, desequilíbrio electrolítico, oligúria, distensão abdominal, derrame pleural e/ou pericárdio e hipercoagulação. Estas alterações patológicas são mediadas principalmente pelo factor de crescimento endotelial vascular (VEGF). A identificação antecipada dos pacientes que poderão desenvolver SHO perante um tratamento padronizado seria de grande vantagem clínica (Fauser, Devroey et al. 1999).

Mulheres jovens, com baixo índice de massa corporal ou com síndrome de ovário poliquístico, e com nível sérico de estradiol aumentado, apresentam maior risco de desenvolver SHO (ASRM 2008). A medida preventiva mais eficaz consiste em não administrar hCG quando há risco da paciente desenvolver SHO, ou seja, quando o estradiol sérico exceder 4000 pg/mL e quando houver mais de 15 folículos maiores que 15 mm visualizados na ecografia. Caso o nível sérico de estradiol seja superior a 4000 pg/mL e os folículos ainda não estejam suficientemente desenvolvidos, a administração de gonadotrofinas é suspensa para que o nível de estradiol baixe para os 3000 pg/mL. No entanto os agonistas da GnRH devem continuar a ser administrados a fim de evitar a ovulação espontânea. Uma vez normalizado o valor de estradiol, a hCG pode ser administrada (Urman, Pride et al. 1992). A criopreservação de embriões com transferência dos mesmos num ciclo posterior é uma solução alternativa para as pacientes em risco de desenvolver SHO (Shoham, Weissman et al. 1994). Alguns autores demonstraram que existe uma relação estreita entre níveis de estradiol elevados e a severidade da SHO, pelo que a quantificação de estradiol pode ser utilizada como marcador preditivo (Rizk 2006).

1.7. Polimorfismo de nucleótido único do gene do receptor da hormona folículo-estimulante

Apesar do facto de genoma humano ser idêntico em 99,9% entre os indivíduos, pequenas diferenças inter-individuais podem diferenciar a resposta a fármacos e conferir predisposição para várias doenças. Os polimorfismos de nucleótido único (SNP) são responsáveis por 90% das variações do genoma humano (Melton 2003).

A estimulação da foliculogénese através de FSH é essencial para o tratamento de infertilidade. As TRA requerem um processo de estimulação ovárica com FSH para maturação dos folículos e ovócitos (Jones 2008), sendo que a taxa de gravidez depende substancialmente da eficácia deste processo (Enskog, Henriksson et al. 1999). No entanto, a classificação da resposta ovárica após administração de FSH exógena é difícil de prever. Por esse motivo, é importante o estudo de factores genéticos no FSHR em pacientes com uma má resposta à estimulação ovárica (Lussiana, Guani et al. 2008). Embora a má resposta à estimulação ovárica possa ser considerada como um sinal de reserva ovárica diminuída, também podem estar subjacentes outros factores, tais como certos polimorfismos do receptor da FSH (FSHR) (de Koning, Benjamins et al. 2006).

A acção da FSH é mediada pelo seu receptor que é expresso exclusivamente nas células da granulosa. Este receptor faz parte da família dos receptores de proteína G (Laven, Mulders et al. 2003). O gene do FSHR localiza-se no braço curto do cromossoma 2 na região 2p21 e é composto por 10 exões e 9 intrões (Figura 5). Os primeiros 9 exões codificam o domínio extracelular aminoterminal do receptor e o exão 10 codifica os domínios transmembranares, intracelulares e C-terminal do receptor (Heckert, Daley et al. 1992; Gromoll, Simoni et al. 1996). O domínio C-terminal do FSHR, localizado no citoplasma, contém muitos resíduos de serina, que podem ser um potencial substrato para a fosforilação do receptor (Salesse, Remy et al. 1991).

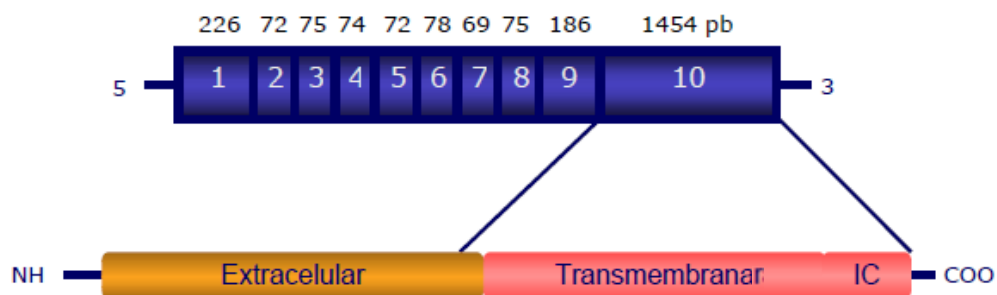


Figura 5 - Representação esquemática da região codificante do receptor da FSH.

Os polimorfismos do gene do FSHR produzem diferentes haplotipos que podem modificar a acção da FSH (Loutradis, Theofanakis et al. 2012). As mutações parcialmente inativadoras e os polimorfismos do FSHR podem parar o crescimento dos folículos antrais ou afectar os estadios finais do crescimento dos mesmos (Loutradis, Vlismas et al. 2008). Existem dois polimorfismos com uma frequência superior a 30% na população que foram identificados na região codificante do exão 10 do FSHR. O primeiro localiza-se na posição 919 no qual uma adenina é substituída por uma guanina, provocando uma alteração no codão 307 pela troca de treonina (ACT) para alanina (GCT). O segundo polimorfismo localiza-se no nucleótido que se encontra na posição 2039, em que uma guanina é substituída por uma adenina, levando a uma troca de aminoácidos de asparagina (Asn); (AGT) para serina (Ser); (AAT) no codão 680 da proteína (Aittomaki, Lucena et al. 1995).

Vários estudos têm fornecido possíveis explicações para os mecanismos moleculares que apoiam a hipótese do polimorfismo Asn680Ser ter influência na resposta ovárica. Em primeiro lugar, deve ser considerado que as várias isoformas do receptor têm provavelmente diferentes afinidades para a FSH. Para além disso, a expressão de receptores nas superfícies celulares diferem nos três genótipos, o que poderia influenciar as interações receptor-ligando. (Zambrano, Zarinan et al. 1999). Presume-se que a presença de asparagina na posição 680 possa facilitar a expressão de receptores através de processo de glicosilação, enquanto a presença de serina pode acelerar a fosforilação e o turnover do receptor. Sendo assim, o polimorfismo no codão 680 do exão 10 do FSHR modularia a função do receptor e a resposta ovárica perante a FSH (Davis, Liu et al. 1995). No entanto, ensaios experimentais *in vitro* não mostraram diferenças na

actividade das isoformas do FSHR (Simoni, Nieschlag et al. 2002; Sudo, Kudo et al. 2002).

As variantes alélicas do gene FSHR na posição 680 resultam em diferentes níveis de FSH basal, dentro dos valores normais, reflectindo diferença na sensibilidade do receptor (Jun, Yoon et al. 2006; Rodini, Genro et al. 2011; Yao, Cai-hong et al. 2011). A variante Ser/Ser foi considerada a menos sensível à acção da FSH pelo facto das pacientes portadoras deste genótipo apresentarem níveis de FSH basal mais elevados (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000; Yao, Cai-hong et al. 2011). Isto sugere que o genótipo Ser/Ser esteja associado a uma proteína do receptor ligeiramente menos sensível à FSH. Consequentemente, ocorrem alterações no mecanismo de 'feedback' do ovário, que leva a um aumento natural da FSH como mecanismo compensatório para permitir o normal crescimento do folículo (Behre, Greb et al. 2005). Uma vez que as pacientes portadoras da variante Ser/Ser tendem a resistir à estimulação pela FSH, é necessário administrar maior quantidade de gonadotrofinas nestas pacientes. Para além disso, a variante Ser/Ser também está associada a níveis de estradiol inferiores aquando da administração da hCG (Sudo, Kudo et al. 2002; de Castro, Ruiz et al. 2003). A variante genotípica Asn/Asn foi considerada a mais sensível à FSH uma vez que, nas mulheres portadoras desta variante, os níveis de FSH basal apresentam-se mais baixos (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000; Yao, Cai-hong et al. 2011). Apesar das diferenças nos níveis de FSH basal e nos níveis de estradiol, não há diferenças entre os vários genótipos no que diz respeito ao número de folículos ou ovócitos puncionados, à taxa de fertilização e de gravidez (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000; Behre, Greb et al. 2005; Jun, Yoon et al. 2006). No entanto, segundo um estudo de Sheikha et al., os valores de FSH basal são semelhantes para as três variantes genotípicas (Sheikha, Eftekhar et al. 2011).

Segundo Loutradis et al., as pacientes classificadas como boas respondedoras tendem a ser portadoras da variante Asn/Ser. Este achado pode reflectir um ovário mais eficiente e com resposta mais rápida à estimulação exógena, possivelmente devido ao FSHR associado ao genótipo Asn/Ser ser mais eficiente (Loutradis, Patsoula et al. 2006). Outro estudo realizado em pacientes submetidas a TRA demonstrou a associação entre a presença do aminoácido serina na posição 680 e a má resposta à estimulação ovárica. Pacientes portadoras do genótipo Ser/Ser têm maior taxa de ciclos cancelados por má resposta quando comparadas com as pacientes portadoras dos genótipos Asn/Ser e Asn/Asn (de Castro, Ruiz et al. 2003). Uma paciente que tenha uma má resposta à estimulação ovárica tem menor probabilidade de engravidar nos ciclos seguintes (Keay,

Liversedge et al. 1997; Karande and Gleicher 1999). A taxa de gravidez varia entre 7,6 e 17,5% em pacientes classificadas como más respondedoras e 25,9% e 36,7% em paciente com resposta normal (Oudendijk, Yarde et al. 2012). Aubriot et al. verificaram que, após transferência de embriões de boa qualidade (tendo em conta o grau de fragmentação, a regularidade dos blastómeros ou o estado de divisão no terceiro dia), não se verifica nenhuma diferença entre as más respondedoras e boas respondedoras no que diz respeito à taxa de gravidez e de abortamento (Aubriot and Chapron 2008).

Para além disso, variações no gene do FSHR podem aumentar a predisposição para o SHO (Rizk 2009). O polimorfismo Asn680Ser no gene do FSHR é um preditor da gravidade dos sintomas em pacientes que desenvolvam SHO (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000; Daelemans, Smits et al. 2004; HasanSheikhha, Eftekhar et al. 2011).

Segundo um estudo de Daelemans et al., dada a associação do alelo Ser680 com a má resposta ovárica, seria de esperar que o alelo Asn680 estivesse associado ao desenvolvimento de uma resposta elevada, isto é, associado a um maior risco de desenvolver SHO. No entanto estes autores verificaram que as pacientes que desenvolveram SHO têm maior frequência do alelo Ser680 quando comparadas com o grupo controlo. A maior prevalência do alelo Asn foi observada nas formas graves de SHO. Estes resultados sugerem que, com base no genótipo na posição 680 do FSHR, não é possível prever quais as pacientes que irão desenvolver SHO, mas este polimorfismo poderia ser um preditor da gravidade dos sintomas das pacientes que desenvolvam SHO. (Daelemans, Smits et al. 2004; Rodien, Beau et al. 2010). Uma possível explicação é que o alelo Ser680 constitui um factor de risco para uma resposta anormal a um tratamento de estimulação padronizado, podendo estar associado tanto a uma má resposta ou uma resposta elevada dependendo de polimorfismos de outros genes (de Castro, Moron et al. 2004).

1.8. Objectivos

O presente estudo teve como principais objectivos:

- Avaliar a prevalência do polimorfismo Asn680Ser do gene do receptor da FSH.
- Correlacionar os genótipos do polimorfismo em estudo com as características biológicas e clínicas das pacientes submetidas a TRA.
- Verificar a existência de influência do polimorfismo Asn680Ser do gene do receptor da FSH na forma como as pacientes respondem ao processo de estimulação ovárica. As pacientes foram classificadas em más respondedoras, pacientes com resposta normal e pacientes com resposta elevada.

2.1. Descrição da população

Este estudo incluiu 498 pacientes que foram submetidas a uma punção folicular seguida de *Fertilização in vitro* ou de injeção intracitoplasmática de um espermatozóide no serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Os critérios de inclusão para o estudo foram: as pacientes terem idade inferior a 40 anos, o doseamento sérico de FSH no 3º dia do ciclo anterior ser inferior ou igual a 12 mUI/mL e história de infertilidade com pelo menos um ano de duração.

As pacientes envolvidas no estudo assinaram um documento de consentimento informado.

2.2. Doseamento Hormonal

As determinações laboratoriais foram processadas no serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em que os níveis de FSH basal (3º dia do ciclo menstrual) foram obtidos num dos ciclos anteriores à estimulação ovárica. Os níveis de estradiol foram medidos no 5º e 8º dia de estimulação.

Os níveis de FSH e estradiol foram determinados por tecnologia quimioluminométrica directa com recurso ao ADVIA Centaur CP, de acordo com as especificações do aparelho (reagentes: ADVIA Centaur E₂-6 III e ADVIA Centaur FSH, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., NY,EU).

2.3. Protocolo de estimulação ovárica

A estimulação ovárica é fundamental no processo de reprodução assistida para que haja uma maior produção de ovócitos em metáfase II. O número de folículos é controlado através de ecografia transvaginal e de doseamentos séricos de estradiol.

A estimulação da ovulação baseia-se em dois tipos de protocolos de estimulação folicular: protocolo longo e protocolo curto.

No protocolo longo, ao 21º dia do ciclo anterior à estimulação, é administrado às pacientes um agonista da GnRH sendo este mantido até ao dia da administração da hCG. Os agonistas da GnRH são utilizados em ciclos de reprodução medicamente assistida para bloquear reversivelmente a função hipofisária e evitar um aumento da LH. A supressão ovárica é avaliada em todas as pacientes ao fim de 12 a 14 dias por ecografia (endométrio fino e ausência de quistos foliculares) e através do valor sérico de estradiol (≤ 50 pg/mL), antes da administração de gonadotrofinas. A FSH recombinante é administrada a partir do 3º dia do ciclo menstrual e a dose a administrar depende de vários factores, entre os quais a idade da paciente e a forma como respondeu em ciclos anteriores (caso já tenha estimulações anteriores). A monitorização ecográfica da resposta folicular e endometrial, bem como a monitorização da resposta hormonal através do doseamento de estradiol, são realizadas ao 6º dia e ao 8º/9º dia de estimulação. Caso se verifique que o crescimento folicular é insuficiente ou que o nível sérico de estradiol é baixo, procede-se a um aumento da dose da FSH recombinante. A hCG é administrada quando pelo menos dois folículos atingirem 17 mm para induzir a maturação folicular final. A punção de ovócitos é realizada 34h após a administração de 10000 UI de hCG.

As mulheres que seguem um protocolo curto de estimulação folicular começam a administração de gonadotrofinas no 3º dia do ciclo. Quando o maior folículo atingir os 14mm de diâmetro é administrado um antagonista da GnRH para prevenir a ovulação espontânea. A monitorização ecográfica e os níveis séricos de estradiol são avaliados no 5º e 7º/8º dia de estimulação. Tal como no protocolo longo, a hCG é administrada quando

pelo menos dois folículos atingirem 17 mm para induzir a maturação folicular final. A punção de ovócitos é realizada 34h após a administração de 10000 UI de hCG.

Para além disso, também é possível a mulher ser submetida a um protocolo curto com citrato de clomifeno e FSH recombinante ou hMG (gonadotrofina da menopausa humana). Neste protocolo, procede-se à estimulação folicular com citrato de clomifeno administrado do 3º ao 7º dia do ciclo em associação com FSH recombinante ou hMG administrada ao 6º, 8º e 10º do ciclo. A monitorização ecográfica da resposta folicular e endometrial bem como a avaliação da resposta hormonal através do doseamento de estradiol é realizada ao 9º/10º dia do ciclo. A hCG é administrada quando pelo menos dois folículos atingirem 17 mm para induzir a maturação folicular final. A punção de ovócitos é realizada 34h após a administração de 10000 UI de hCG.

2.4. Genotipagem do polimorfismo Asn680Ser do receptor da FSH

2.4.1. Extração de ADN

A extração de ADN é feita a partir de sangue total colhido em tubo de EDTA-K3 (ácido etilenodiamino tetra-acético), através do kit QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN, Germany), de acordo com o fabricante, acrescentando algumas alterações.

Procedeu-se a três lavagens consecutivas da amostra de 500 µL com 1mL de tampão tris-EDTA (1M tris; 0,5M EDTA, pH=8), centrifugando as amostras a 13000 r.p.m. (20000 x g) durante 5 minutos e desprezando o sobrenadante a fim de solubilizar os ácidos nucleicos e de os proteger da degradação.

A fim de se dar a lise das células nucleadas, homogeneizou-se a amostra com 20 µL de protease e adicionaram-se 200 µL de tampão de lise. As amostras foram colocadas no vórtex durante 15 segundos e incubadas a 56°C durante 15 minutos. Adicionaram-se 200µL de etanol absoluto. As amostras foram então colocadas no interior de uma coluna de extração de ADN, centrifugadas a 8000 r.p.m. (6000 x g) durante 1 minuto, tendo sido desprezado o filtrado e a coluna colocada num novo tubo. Procedeu-se depois à lavagem com tampão de lavagem 1 (pela adição de 500 µL do mesmo à amostra e centrifugação a 8000 r.p.m. (6000 x g) durante 1 minuto, em que é desprezado o

sobrenadante e a coluna colocada num tubo novo) e com tampão de lavagem 2 (pela adição de 500 µL do mesmo à amostra e centrifugação a 13000 r.p.m.(20000 x g) durante 5 minutos, em que foi desprezado o sobrenadante e a coluna colocada num tubo novo). A coluna foi então colocada num tubo de microcentrífuga e adicionaram-se 100 µL de tampão de eluição. Após centrifugação da amostra a 13000 r.p.m. (20000 x g) durante 1 minuto, recolheu-se o ADN no tubo de microcentrífuga.

2.4.2. Quantificação de ADN

Procedeu-se à quantificação de ADN das amostras por espectrofotometria, com leitura das absorvâncias dos comprimentos de onda de 260 nm. Para este efeito, utilizou-se o aparelho de espectrofotometria Shimadzu UV-1603. Verificou-se que a concentração das amostras era de aproximadamente 50 ng/µL.

2.4.3. Reacção de Polimerização em cadeia

O polimorfismo do gene do receptor de FSH na posição 680 foi determinado através de reacção de polimerização em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction), sendo o substrato desta reacção o ADN genómico previamente extraído. Amplificou-se um fragmento do exão 10 do gene do FSHR correspondente à região entre os nucleótidos 1624 a 2143. O tamanho do fragmento, bem como os oligonucleótidos e a temperatura de emparelhamento estão referidos na tabela I. A reacção de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL, contendo duas unidades de Taq Polimerase (Invitrogen, CA,EUA), 0,2 µM de dNTP's, 0,4 µM de cada oligonucleótido, sendo posteriormente amplificada no termociclador C1000 Thermal Cycler (Biorad, Hercules,EUA).

Posteriormente, realizou-se uma electroforese em gel de agarose a 1,5%, em que os produtos da PCR foram visualizados com recurso ao brometo de etídio, que se intercala entre os pares de bases de ADN e que apresenta propriedades fluorescentes sob excitação da luz ultravioleta. Todos os produtos de PCR foram fotografados com recurso a uma câmara MiniBis Pro (DNR- Bio-Imaging Systems, Israel).

Tabela I - Condições de amplificação por PCR

Exão	Tamanho	Temperatura de annealing	Oligonucleótidos
Exão 10	520pb	60°C	F: 5'TTTGTGGTCATCTGTGGCTGG3' R: 5'CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT3'
F:sense	R: anti-sense		

2.4.4. Análise do polimorfismo de nucleótido único do gene do receptor da FSH através de enzimas de restrição

O polimorfismo Asn680Ser localizado no exão 10 do gene do receptor da FSH foi analisado através de enzimas de restrição por PCR-RFLP (RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*), conforme apresentado na tabela II.

O produto da PCR foi digerido com a enzima FastDigest BseNI (Fermentas Life Science INC., Canadá). A digestão foi otimizada para o volume final de 15 µL, contendo 0,5 µL de enzima e 5 µL de produto de PCR, consoante instruções do fabricante. Os produtos resultantes da digestão da endonuclease de restrição foram visualizados em géis de agarose a 1,5%, sob luz UV, em que os fragmentos de ADN foram corados com brometo de etídio e fotografados com o sistema de imagem MiniBis Pro (DNR- Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

Tabela II - Condições para enzima de restrição

Exão	Enzima de Restrição	Temperatura	Tempo de aquecimento	Temperatura de inativação	Tempo de inativação
10	BseNI	65 °C	5 min	80°C	5 min

2.5. Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente recorrendo ao programa Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0 (SPSS Inc, EUA).

Realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para análise da variância quando não se verificou homogeneidade da variância a fim de comparar características biológicas das pacientes e os resultados do processo de estimulação ovárica entre os diferentes genótipos e os diferentes tipos de resposta. Para avaliar entre que grupos existiam diferenças estatísticas aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Recorreu-se ao teste ANOVA para a análise da variância quando se verificou homogeneidade da variância. Realizou-se ainda o teste de χ^2 para analisar a relação de independência entre as variáveis qualitativas nominais.

Verificou-se que a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo estudado.

Capítulo III - Resultados

3.1. Análise da população

Este estudo incluiu 498 pacientes que foram submetidas a TRA no serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

As pacientes têm uma idade média de $34 \pm 3,6$ anos, sendo os níveis de FSH no 3º dia do ciclo menstrual de $6,3 \pm 2$ mUI/mL. Para o processo de estimulação ovárica, foi administrada FSH recombinante ou hMG, numa média de $1923,2 \pm 588,1$ UI. Após este processo, as pacientes apresentavam, no dia da administração da hCG, um valor médio de estradiol de $569,7 \pm 407,4$ pg/mL e um número médio de folículos de $13 \pm 7,6$. A média de ovócitos obtidos após punção folicular foi de $9 \pm 6,5$, sendo a taxa de gravidez de 26,8%.

Para uma paciente ser classificada como má respondedora tem de apresentar pelo menos dois ciclos anteriores de má resposta (com três ou menos ovócitos) ou apresentar um episódio anterior de má resposta e ter um teste de reserva ovárica anormal (AMH inferior a 0,5 ng/mL). Ter idade avançada também é um factor para a classificação das más respondedoras. No entanto, uma vez que a legislação portuguesa não permite a realização de técnicas de reprodução assistida em mulheres com idade igual ou superior a 40 anos nas unidades públicas (circular da administração Central de Sistemas de Saúde (ACSS), de 12 de Agosto de 2010), neste estudo o critério idade não pode ser aplicado para classificar as pacientes como más respondedoras.

Uma vez que não existe consenso relativamente à classificação das pacientes com resposta elevada, considerou-se que dois ciclos de estimulação com doze ou mais ovócitos ou um ciclo de estimulação com quinze ou mais ovócitos obtidos após punção folicular seriam critérios para classificar uma resposta elevada.

3.2. Identificação do genótipo do receptor da FSH

O genótipo do receptor da FSH foi determinado através da técnica de PCR-RFLP com recurso a uma enzima de restrição que tem local de corte no codão 680 do exão 10 do FSHR. A transição de uma adenina por uma guanina no nucleótido localizado na posição 2039 leva à troca do aminoácido na posição 680, de asparagina (AAT) para serina (AGT). Nesta situação a enzima vai criar um local de corte. A presença de uma banda não digerida (520pb) indica que estamos perante uma homozigotia para o genótipo Asn/Asn. A existência de bandas digeridas (413pb) indica uma homozigotia para o alelo serina, ao passo que a presença de duas bandas, uma digerida e outra não, traduz uma heterozigotia Asparagina/Serina (figura 6). No gel de agarose, juntamente com as amostras, também se corre um controlo positivo, que corresponde a um controlo interno da reacção cujo genótipo já é conhecido a fim de verificar a reprodutibilidade do teste, e um controlo negativo (controlo não-digerido), que corresponde a um produto de PCR sem adição de enzima de restrição a fim de confirmar a ausência de contaminação.



Figura 6 – Análise do polimorfismo Asn680Ser do gene do receptor da FSH por PCR-RFLP. Após digestão do produto da PCR com a enzima de restrição BseNI, o gel de agarose a 1,5% revela os 'padrões' apresentados. Os poços 2,3,4,6,7,8 apresentam duas bandas, de 520 e 413 pb, que correspondem à variante Asn/Ser, enquanto que o poço 5 apresenta uma banda de 520 pb correspondente à variante Asn/Asn e os poços 1,9 e 10 apresentam uma banda de 413 pb que corresponde à variante alélica Ser/Ser. M representa o marcador de peso molecular de 100 pb. Pos representa o controlo positivo e N/D o controlo não digerido.

3.3. Correlação dos diferentes genótipos do receptor da FSH com os parâmetros clínicos e biológicos

Investigou-se a distribuição do polimorfismo de nucleótido único Asn680Ser em 498 pacientes submetidas a um processo de estimulação ovárica. A distribuição dos diferentes genótipos na amostra é de 35,6% para a variante genotípica Asn/Asn, 49,8% para Asn/Ser e 14,6% para o genótipo Ser/Ser. A média da idade das pacientes é semelhante em todos os grupos, 34 ± 4 anos. Procedeu-se à análise dos parâmetros clínicos e biológicos tendo em conta as variantes genotípicas (Asn/Asn, Asn/Ser, Ser/Ser). Os resultados encontram-se resumidos na tabela III.

Tabela III – Características clínicas e biológicas das 498 pacientes submetidas a TRA, agrupadas de acordo com o polimorfismo do receptor da FSH

	Idade	FSH basal (mUI/mL)	E ₂ 5º dia (pg/mL)	nº folículos 5º dia	E ₂ dia hCG (pg/mL)	nº folículos dia hCG	Dose FSH _r (UI)	Ovócitos obtidos	Taxa de gravidez
Asn/Asn	$34 \pm 3,5$	$5,99 \pm 1,9$	526 ± 385	10 ± 6	$2042 \pm 1471,3$	13 ± 7	$1950,6 \pm 579$	9 ± 6	23,1%
Asn/Ser	$34 \pm 3,6$	$6,39 \pm 2$	$610 \pm 431,8$	10 ± 6	$1942,3 \pm 1371$	13 ± 8	$1919,9 \pm 593,2$	9 ± 6	32,1%
Ser/Ser	$34 \pm 3,7$	$6,43 \pm 2,2$	$564 \pm 395,2$	10 ± 7	$1705,3 \pm 960,5$	13 ± 9	$1836,7 \pm 585,8$	8 ± 8	25%

Teste de Kruskal Wallis para análise da variância

Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos no que diz respeito à quantificação da FSH basal ($p=0,100$), o grupo das pacientes portadoras da variante genotípica Ser/Ser parece ter uma tendência para apresentar valores de FSH no 3º dia do ciclo menstrual (FSH basal) ligeiramente mais elevados ($6,43 \pm 2,2$ mUI/mL). A dose de gonadotrofinas necessárias para o processo de estimulação ovárica, bem como os níveis de estradiol no 5º dia de estimulação e no dia da administração da hCG não apresentam diferenças estatisticamente significativas para as três variantes genotípicas. Independentemente do genótipo, as pacientes responderam de forma semelhante ao processo de estimulação ovárica, apresentando um número médio de folículos no dia da administração da hCG semelhante, bem como um número de ovócitos obtidos após punção folicular similar. A taxa de gravidez não apresenta diferenças significativas quando analisada tendo em conta os diferentes

genótipos (23,1% para a variante Asn/Asn, 25% para a variante Ser/Ser e 32,1% para a variante genotípica Asn/Ser).

3.4. Correlação dos diferentes tipos de resposta ovárica com os parâmetros clínicos e biológicos

Tendo em conta a classificação das pacientes consoante o tipo de resposta ovárica, observou-se que 10,7% das pacientes são más respondedoras, ao passo que 70,8% obtiveram uma resposta normal e 18,5% apresentaram uma resposta elevada após estimulação ovárica. Ao avaliar o valor da FSH basal de acordo com a resposta à estimulação, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos ($p=0,248$); (Tabela IV).

Tabela IV– Características clínicas e biológicas das 498 pacientes submetidas a TRA, agrupadas de acordo a resposta ao processo de estimulação ovárica

	Idade	FSH basal (mUI/mL)	E ₂ 5º dia (pg/mL)	nº folículos 5º dia	E ₂ dia hCG (pg/mL)	nº folículos dia hCG	Dose FSH _r (UI)	Ovócitos obtidos	Taxa de gravidez
Má resposta	34 ± 3,5	6,43 ± 2,5	430,2 ± 301,2 ^{a,b}	7 ± 6 ^{d,e}	1312,3 ± 958,2 ^g	9 ± 8 ^h	2144,4 ± 599,9 ⁱ	3 ± 3 ^j	3% ^{k,l}
Resposta normal	34 ± 3,7	6,34 ± 2,1	554,8 ± 407,3 ^{a,c}	10 ± 6 ^{e,f}	1791,3 ± 1271,4 ^g	12 ± 6,4 ^h	1915,8 ± 573,6	7 ± 4 ^j	28 % ^k
Resposta elevada	33 ± 3,5	5,9 ± 1,4	696,4 ± 432,6 ^{b,c}	14 ± 7 ^{d,f}	2846,9 ± 1442,5 ^g	20 ± 7,6 ^h	1857 ± 627,3 ⁱ	19 ± 6 ^j	29,1 % ^l

Teste de Kruskal Wallis para análise da variância, excepto para FSH_r em que foi realizado o teste ANOVA

b,d,g,h,j <0,001 c,f ,k,l<0,01 a,e,i < 0,05

Verificou-se haver homogeneidade entre os diversos tipos de resposta no que diz respeito à idade (más respondedoras: 34±3,5 anos, pacientes com resposta normal: 34±3,7 anos, e pacientes com resposta elevada: 33±3,5 anos). O grupo das más respondedoras apresentou níveis de estradiol no 5º dia de estimulação e no dia da hCG mais baixos relativamente aos dois outros grupos ($p<0,001$); (Figura 7). O número de folículos visíveis por ecografia, tanto no 5º dia de estimulação como no dia da hCG, também é inferior no grupo das más respondedoras quando comparado com as pacientes que apresentam resposta normal e elevada ($p<0,001$). As pacientes más

respondedoras foram estimuladas com maior dose de gonadotrofinas quando comparadas com o grupo das pacientes que desenvolveram uma resposta elevada ($p=0,023$); (Figura 8). As pacientes classificadas como más respondedoras apresentam uma taxa de gravidez muito baixa (3%), enquanto que as pacientes com resposta normal e elevada apresentam uma taxa de gravidez semelhante, 28% e 29,1%, respectivamente ($p=0,007$).

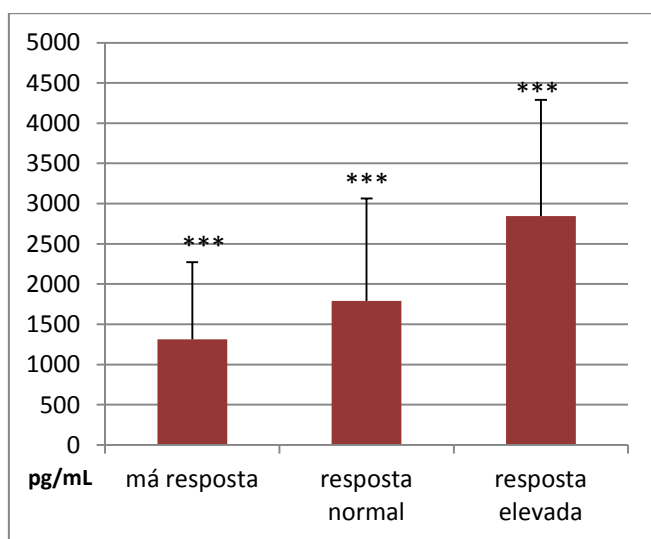


Figura 7 – Distribuição do estradiol no dia da hCG tendo em conta a resposta à estimulação ovárica. *** $p<0,001$

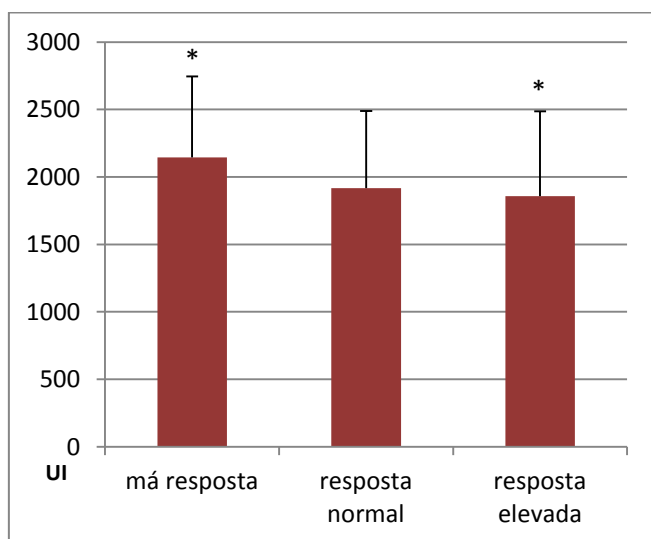


Figura 8 – Distribuição da dose de FSH recombinante administrada, tendo em conta a resposta à estimulação ovárica. * $p<0,05$

3.5. Avaliação da resposta à estimulação ovárica com base no genótipo

Pretendeu-se verificar se o polimorfismo de nucleótido único na posição 680 do gene do FSHR poderia interferir na eficácia das TRA (tabela V; $p < 0,001$). De entre as pacientes Asn/Asn, apenas 5,4% são más responderas, 75,9% apresentam uma resposta normal e 18,7% têm uma resposta elevada, havendo diferenças estatisticamente significativas entre os três tipos de resposta. Tal como a variante genotípica Asn/Asn, também o genótipo Asn/Ser está mais fortemente associado à obtenção de uma resposta normal (73,3%), sendo que 8,2% das pacientes Asn/Ser são más respondedoras e 18,5% apresentam uma resposta elevada, havendo diferenças estatisticamente significativas entre os três tipos de resposta. De entre o grupo das pacientes com genótipo Ser/Ser, 32,4% são más respondedoras, 50% obtiveram uma resposta normal e 17,6% apresentaram uma resposta elevada, sendo que apenas existe diferença estatisticamente significativa entre as pacientes que desenvolveram uma resposta normal e as que desenvolveram uma resposta elevada ($p = 0,001$).

Tabela V – Análise dos diferentes genótipos do polimorfismo do receptor da FSH tendo em conta a resposta à estimulação ovárica

	Má resposta	Resposta normal	Resposta elevada	Total
Asn/Asn	5,4% ^{a,c}	75,9% ^{a,b}	18,7% ^{b,c}	100%
Asn/Ser	8,2% ^{d,f}	73,3% ^{d,e}	18,5% ^{e,f}	100%
Ser/Ser	32,4%	50% ^g	17,6% ^g	100%

a,b,d,e < 0,001 c,f,g < 0,01

A má resposta ovárica é representada maioritariamente por pacientes portadoras do genótipo Ser/Ser (44%), sendo que as pacientes Asn/Ser e Asn/Asn representam, respectivamente, 38% e 18% da má resposta ovárica (tabela VI). No entanto, apenas existe diferença estatisticamente significativa entre a distribuição do genótipo Asn/Asn e Ser/Ser nas más respondedoras ($p = 0,02$). Por outro lado, a resposta normal é representada maioritariamente pelo genótipo Asn/Ser (51,5%), sendo que a variante Ser/Ser representa apenas 10,3% da resposta normal ($p < 0,001$). A variante Ser/Ser também está fracamente associada à obtenção de uma resposta elevada ao processo de estimulação ovárica, sendo que apenas 14% das pacientes que apresentam uma resposta elevada são portadoras do genótipo Ser/Ser.

Tabela VI – Análise da resposta à estimulação ovárica com base no polimorfismo do receptor da FSH

	Má respondedora	Resposta normal	Resposta elevada
Asn/Asn	18% ^a	38,2% ^{b,d}	36% ^e
Asn/Ser	38%	51,5% ^{c,d}	50% ^f
Ser/Ser	44% ^a	10,3% ^{b,c}	14% ^{e,i}
Total	100%	100%	100%

b,c,f < 0,001 a,d,e < 0,05

A FSH é essencial para assegurar as normais funções reprodutoras. Devido à importante acção da FSH na esteroidogénese ovárica e no crescimento folicular, a presença de polimorfismos ou mutações no gene do FSHR podem afectar a capacidade reprodutiva (Gromoll, Simoni et al. 1996). A identificação do polimorfismo Asn680Ser do FSHR levou à investigação do seu valor como potencial preditor da resposta ovárica após estimulação exógena para realização de *Fertilização in vitro* ou injeção intracitoplasmática de um espermatozóide.

4.1. Características clínicas e biológicas associadas ao genótipo

Os níveis séricos da FSH no terceiro dia do ciclo menstrual prevêm a resposta ovárica, considerando a existência de variação intra-individual de ciclo para ciclo (Loutradis, Elsheikh et al. 2004). Ao contrário de alguns estudos anteriores que sugerem que a variante genotípica Ser/Ser é mais prevalente entre as pacientes com níveis de FSH basal significativamente mais elevados (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000; Loutradis, Patsoula et al. 2006; Yao, Cai-hong et al. 2011), verificou-se não haver diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos no que diz respeito ao valor de FSH basal, provavelmente devido ao facto de níveis de FSH superiores a 12 mUI/mL serem um critério de exclusão. Estudos mais recentes apresentam resultados semelhantes aos obtidos no nosso estudo, segundo os quais as concentrações séricas de FSH basal não diferem entre as variantes do polimorfismo Asn680Ser (Kuijper, Blankenstein et al. 2010; Sheikhha, Eftekhari et al. 2011). No entanto, e apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, a variante Ser/Ser parece apresentar uma ligeira tendência para se associar a valores de FSH basal mais elevados, possivelmente devido a alterações no mecanismo de 'feedback', o que leva a um aumento natural da FSH como mecanismo compensatório (Behre, Greb et al. 2005).

Kuijper et al. demonstraram que a etnia não tem influência no valor da FSH basal (Kuijper, Blankenstein et al. 2010). No entanto, estes autores verificaram haver diferenças na distribuição do genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR na população com problemas de infertilidade tendo em conta as diversas etnias. Relativamente à variante genotípica Ser/Ser, o estudo mostrou que 10,5% da população asiática apresenta este genótipo, ao passo que representa 21,5% na população caucasiana e 22,3% na

população mediterrânea (Kuijper, Blankenstein et al. 2010). No nosso estudo, a análise da frequência dos genótipos mostrou que a variante Ser/Ser está presente em 14,6% das pacientes, frequência esta inferior à apresentada no estudo anteriormente referido para a população caucasiana. No entanto, a distribuição da variante Asn/Ser na população caucasiana no nosso estudo é similar à distribuição apresentada no estudo anterior (48,9% e 49,8%, respectivamente).

Perez-Mayorga et al. (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000) observaram que a dose de FSH exógena necessária para um processo de estimulação apropriado é significativamente superior para a variante Ser/Ser uma vez que este receptor seria menos sensível à acção da FSH. Por outro lado, a variante Asn/Asn estaria associada um receptor mais sensível à FSH, sendo que as portadoras desta variante apresentam níveis de FSH basal mais baixos relativamente ao genótipo Ser/Ser (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000), pelo que necessitam de doses menos elevadas de gonadotrofinas para o processo de estimulação ovárica (Behre, Greb et al. 2005). No entanto, as pacientes submetidas a TRA que estão englobadas neste estudo parecem não ser favorecidas pela presença do genótipo Asn/Asn, uma vez que não há diferenças estatisticamente significativas entre as três variantes genóticas no que diz respeito à dose de FSH exógena necessária para o processo de estimulação, ou seja, parece que o receptor Asn/Asn não será mais sensível à acção da FSH. Deste modo, o polimorfismo Asn680Ser parece não ter uma influência directa na quantidade de FSH exógena a administrar. Embora sem significado estatístico, o genótipo Ser/Ser mostra uma tendência para apresentar níveis mais baixos de estradiol no dia da administração da hCG. Esta resposta mais baixa pode ser ultrapassada através do aumento da dose de FSH recombinante a administrar, isto é, para atingir níveis de estradiol semelhantes, as pacientes homozigóticas Ser680 necessitam de maior dose de FSH exógena quando comparadas com as pacientes Asn/Asn e Asn/Ser. Um estudo de Yao et al. (Yao, Cai-hong et al. 2011) demonstra haver diferenças na dose de FSH exógena a administrar dependendo da etnia, observando que na população asiática, as pacientes Ser/Ser necessitam de uma dose notavelmente superior de FSH exógena para o processo de estimulação, o que não se verifica na população caucasiana. Aquando prescrição da dose de FSH exógena necessária para a estimulação ovárica não é tido em conta o genótipo da paciente (Boudjenah, Molina-Gomes et al. 2012).

Contudo, o resultado das TRA, definido pelo número de ovócitos obtidos após punção folicular ou pela taxa de gravidez, não foi afectado pelo polimorfismo em estudo. As três

variantes genotípicas apresentam um número semelhante de folículos pré-ovulatórios e de ovócitos obtidos após punção folicular. Para além disso, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à taxa de gravidez, apesar do grupo Asn/Ser apresentar uma taxa superior (32,1%) em comparação com o grupo Ser/Ser e Asn/Asn que apresentam uma taxa de gravidez de 25% e 23,1%, respectivamente. Este resultado sugere que o tratamento foi igualmente bem-sucedido, independentemente da isoforma do FSHR, o que vai ao encontro do estudo de Anagnostou (Anagnostou, Mavrogianni et al. 2012), que verificou não haver predomínio de nenhum genótipo sobre outro relativamente às taxas de gravidez. Um estudo recente demonstra não haver diferenças na resposta ao tratamento de estimulação ovárica em mulheres com diferentes polimorfismos no codão 680 do gene do FSHR (Mohiyiddeen, Newman et al. 2012).

4.2. Características clínicas e biológicas associadas à resposta ovárica

A má resposta ovárica perante um processo de estimulação não é incomum e é um factor preditor de uma baixa taxa de gravidez (Hellberg, Waldenstrom et al. 2004). Embora se pudesse pensar que a má resposta poderia ser superada simplesmente através do aumento da dose de gonadotrofinas, a literatura sugere que tal não se verifica. As pacientes más respondedoras apresentam uma resposta deficiente mesmo após estimulação com doses mais elevadas de gonadotrofinas, podendo mesmo levar ao cancelamento do ciclo de estimulação (Keay, Liversedge et al. 1997). De facto, as más respondedoras, apesar de terem sido estimuladas com maior dose de FSH exógena relativamente aos outros grupos, representam o grupo que apresentou menor número de folículos no dia da administração da hCG, bem como menor concentração sérica de estradiol no dia da hCG. Consequentemente, as más respondedoras apresentam uma baixa taxa de gravidez (Garcia, Jones et al. 1983). De facto, verificou-se que as pacientes más respondedoras apresentam uma taxa de gravidez muito baixa (3%) em relação às pacientes com resposta normal e elevada (28% e 29,1%, respectivamente). Por outro lado, tem sido relatado em vários estudos que a obtenção de 5 a 15 ovócitos obtidos após punção folicular pode conduzir a uma boa evolução clínica das TRA, isto é, uma paciente que tenha uma resposta normal ao processo de estimulação ovárica apresenta

maior probabilidade de êxito das TRA (De Vries, De Sutter et al. 1999; Sharma, Allgar et al. 2002)

A noção que uma paciente tem níveis elevados de FSH basal como resultado de um receptor menos sensível pode ter implicações na concentração da FSH exógena a administrar a fim de se obter maior número de folículos pré-ovulatórios. No entanto, não se obteve correlação entre os níveis de FSH basal e de FSH exógena administrada uma vez que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito aos níveis de FSH basal, apesar de parecer haver uma ligeira tendência para as más respondedoras apresentarem níveis de FSH basal mais elevados.

A homogeneidade nos diferentes tipos de resposta no que diz respeito ao factor idade poder-se-á dever ao facto de mulheres com idades mais avançada, a partir dos 40 anos de idade, não fazerem parte do estudo uma vez que a legislação portuguesa não permite a realização de TRA nestas pacientes em unidades públicas (circular da Administração Central de Sistemas de Saúde (ACSS), de 12 de Agosto de 2010). Deste modo, a diminuição da reserva ovárica pelo aumento da idade, que também pode ser um factor que conduz a uma má resposta, não teve influência directa nos resultados obtidos.

4.3. Influência do genótipo na resposta ovárica

Seria de grande utilidade conseguir identificar as más respondedoras antes de darem início ao processo de estimulação para ajudar a garantir que recebam uma dose optimizada de gonadotrofinas. A genotipagem do polimorfismo Asn680Ser no gene do FSHR pode fornecer um meio de identificação das pacientes más respondedoras antes do início das TRA (Simoni, Tempfer et al. 2008).

Observou-se que a distribuição genotípica no grupo das pacientes com resposta elevada e resposta normal é semelhante uma vez que, em ambos os grupos, o genótipo Ser/Ser é pouco representado (10,3% e 14%, respectivamente), havendo um predomínio do genótipo Asn/Ser (51,5% e 50%, respectivamente). Este predomínio pode ser o resultado de uma resposta ovárica mais rápida à estimulação exógena, possivelmente devido à maior eficiência do FSHR associado à variante Asn/Ser (Loutradis, Patsoula et al. 2006).

Em contrapartida, também existe maior risco das pacientes portadoras da variante genotípica Asn/Ser desenvolverem SHO em consequência do desenvolvimento de uma resposta exagerada ao processo de estimulação ovárica. Nenhuma das pacientes submetidas a TRA englobadas neste estudo desenvolveu esta complicação, induzindo-se o cancelamento do ciclo caso apresentassem indícios de poder desenvolver SHO. Um estudo de Daelemans et al. (Daelemans, Smits et al. 2004) apresentou uma maior frequência da variante Ser/Ser em pacientes com SHO. No entanto, a variante Asn/Asn está associada a um SHO mais grave. O estudo do genótipo não permite deste modo determinar quais são as pacientes que estão em risco de desenvolver este síndrome mas, em contrapartida, poderá prever a gravidade dos sintomas (Rizk 2009).

Um estudo retrospectivo em pacientes submetidas a TRA demonstrou haver uma associação entre a presença da variante Ser/Ser e uma menor sensibilidade à FSH, isto é, maior probabilidade de má resposta ovárica (de Castro, Ruiz et al. 2003). De facto, esta variante genotípica representa 44% das más respostas, ao passo que Asn/Asn representa somente 18% das más respondedoras. No entanto, o genótipo Asn/Ser também é bastante representativo da má resposta ovárica.

Quando se analisa o genótipo tendo em conta a resposta ovárica, verifica-se que, dentro da variante Ser/Ser, 50% das pacientes apresentam resposta normal e 32,4% são más respondedoras. As portadoras da variante Ser/Ser apresentam menor probabilidade de desenvolver resposta elevada. Observou-se que as pacientes Asn/Asn e Asn/Ser têm baixa probabilidade de vir a desenvolver uma má resposta (5,4% e 8,2%, respectivamente), estando estas duas variantes associadas à obtenção de uma resposta normal. Sendo assim, parece haver uma tendência para as pacientes Ser/Ser apresentarem uma má resposta ovárica quando comparadas com as pacientes portadoras dos outros genótipos.

É possível que o polimorfismo Asn680Ser do FSHR apenas tenha impacto na resposta ovárica e no recrutamento folicular quando na presença de outros polimorfismos (Anagnostou, Mavrogianni et al. 2012). Existem vários estudos que analisam o polimorfismo Asn680Ser em associação com outro polimorfismo situado na região codificante do exão 10 do FSHR – Thr307Ala. Simoni et al. (Simoni, Gromoll et al. 1999) demonstraram que estes dois polimorfismos estariam em desequilíbrio de ligação, o que poderia resultar em duas combinações das isoformas do receptor de FSH, sendo a variante alélica Ala307-Ser680 a mais prevalente (Livshyts, Podlesnaja et al. 2009). Dada a existência de um desequilíbrio entre estes dois polimorfismos, tornar-se-ia

desnecessário o estudo de ambos. No entanto, um estudo recente põe em causa esta ligação entre os dois polimorfismos acima referidos (Rodini, Genro et al. 2011). Sendo assim, o estudo de ambos os polimorfismos poderá ser relevante para prever a forma como as mulheres irão responder ao processo de estimulação ovárica.

Actualmente, dado o aumento do recurso às TRA por parte dos casais com problemas de infertilidade, tornou-se importante a optimização do processo de estimulação ovárica. Para além disso, o sistema nacional de saúde financia apenas três tratamentos de fertilidade por mulher (circular da Administração Central de Sistemas de Saúde, de 12 de Agosto de 2010), daí a extrema importância do sucesso dos tratamentos desde a primeira estimulação.

Para tal estudou-se a hipótese do polimorfismo na posição 680 do exão 10 do gene do receptor da FSH influenciar a resposta ovárica. De facto, parece existir uma associação entre este polimorfismo do receptor da FSH e a forma como as pacientes respondem ao tratamento de estimulação ovárica. No entanto, e uma vez que esta relação não é linear, não se pode estabelecer a dose de FSH recombinante a administrar unicamente com base no polimorfismo Asn680Ser, isto é, não se pode prever de forma objectiva a forma como a mulher irá responder ao processo de estimulação ovárica tendo por base unicamente o polimorfismo em estudo. No entanto, pode-se inferir que uma paciente portadora do genótipo Asn/Asn ou Asn/Ser apresenta baixa probabilidade de vir a desenvolver uma má resposta ovárica. Pelo contrário, uma paciente Ser/Ser tem maior probabilidade de vir a desenvolver uma má resposta e, por isso, apresenta maior risco de cancelamento do ciclo de estimulação.

No entanto, e uma vez que esta associação não é linear, como referido anteriormente, o alelo Ser680 isoladamente poderá não ser suficiente para causar uma má resposta perante uma estimulação com gonadotrofinas. Esta hipótese é apoiada pelo facto de não existirem diferenças biológicas entre as diferentes variantes genótípicas (uma vez que todas as pacientes apresentaram uma média da FSH basal semelhante) nem clínicas (uma vez todos os grupos apresentaram valores de estradiol, número de folículos e de ovócitos obtidos após punção folicular semelhantes). Para além disso, todas as variantes genótípicas apresentaram taxas de gravidez semelhante.

De salientar que existe uma grande heterogeneidade de resultados publicados no que diz respeito a eficácia de um marcador genético para avaliar a predisposição da resposta ovárica. Esta heterogeneidade pode expressar-se pela diferente susceptibilidade individual resultante da contribuição de múltiplos factores (genéticos e ambientais) para um determinado efeito fenotípico.

Aitken, R. J., M. A. Baker, et al. (2008). "As the world grows: contraception in the 21st century." J Clin Invest **118**(4): 1330-43.

Aittomaki, K., J. L. Lucena, et al. (1995). "Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure." Cell **82**(6): 959-68.

Al-Azemi, M., S. R. Killick, et al. (2010). "Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction." Hum Reprod **26**(2): 414-22.

Al-Azemi, M., S. R. Killick, et al. (2011). "Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction." Hum Reprod **26**(2): 414-22.

Almeida-Santos, T. (2009). Fisiologia do ovário e da fecundação. Manual de Ginecologia. C. Oliveira, Permanyer Portugal. **Vol.I:** 39-56.

Amsterdam, A. and S. Rotmensch (1987). "Structure-function relationships during granulosa cell differentiation." Endocr Rev **8**(3): 309-37.

Anagnostou, E., D. Mavrogianni, et al. (2012). "ESR1, ESR2 and FSH receptor gene polymorphisms in combination: a useful genetic tool for the prediction of poor responders." Curr Pharm Biotechnol **13**(3): 426-34.

Anckaert, E., J. Smits, et al. (2012). "The value of anti-Mullerian hormone measurement in the long GnRH agonist protocol: association with ovarian response and gonadotrophin-dose adjustments." Hum Reprod **27**(6): 1829-39.

Arslan, M., S. Bocca, et al. (2005). "Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr." Fertil Steril **84**(3): 555-69.

ASRM (2008). "Ovarian hyperstimulation syndrome." Fertil Steril **90**(5 Suppl): S188-93.

Aubriot, F. X. and C. Chapron (2008). "[FSH and IVF management: the best and worst case scenarios]." Gynecol Obstet Fertil **36**(6): 636-40.

Bancsi, L. F., F. J. Broekmans, et al. (2002). "Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve." Fertil Steril **77**(2): 328-36.

Barnett, K. R., C. Schilling, et al. (2006). "Ovarian follicle development and transgenic mouse models." Hum Reprod Update **12**(5): 537-55.

Beckers, N. G., N. S. Macklon, et al. (2002). "Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging." Fertil Steril **78**(2): 291-7.

Behre, H. M., R. R. Greb, et al. (2005). "Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation." Pharmacogenet Genomics **15**(7): 451-6.

Berga, S. and F. Naftolin (2012). "Neuroendocrine control of ovulation." Gynecol Endocrinol **28 Suppl 1**: 9-13.

Binder, H., R. Strick, et al. (2012). "Assessment of FSHR variants and antimullerian hormone in infertility patients with a reduced ovarian response to gonadotropin stimulation." Fertil Steril **97**(5): 1169-75 e1.

Boudjenah, R., D. Molina-Gomes, et al. (2012). "Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI." PLoS One **7**(6): e38700.

Broekmans, F. J., D. de Ziegler, et al. (2010). "The antral follicle count: practical recommendations for better standardization." Fertil Steril **94**(3): 1044-51.

Broekmans, F. J., G. J. Scheffer, et al. (1998). "Ovarian reserve tests in infertility practice and normal fertile women." Maturitas **30**(2): 205-14.

Byskov, A. G. and P. E. Hoyer (1988). "The physiology of reproduction." Knobil E, Neill J, editors. New York: Raven Press: 265-97.

Caraty, A., A. Locatelli, et al. (1989). "Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol." J Endocrinol **123**(3): 375-82.

Carlsson, I. B., J. E. Scott, et al. (2006). "Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro." Hum Reprod **21**(9): 2223-7.

Daelemans, C., G. Smits, et al. (2004). "Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism." J Clin Endocrinol Metab **89**(12): 6310-5.

Dalkin, A. C., D. J. Haisenleder, et al. (1989). "The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression." Endocrinology **125**(2): 917-24.

Davis, D., X. Liu, et al. (1995). "Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function." Mol Endocrinol **9**(2): 159-70.

de Castro, F., F. J. Moron, et al. (2004). "Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait." Pharmacogenetics **14**(5): 285-93.

de Castro, F., R. Ruiz, et al. (2003). "Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone." Fertil Steril **80**(3): 571-6.

de Koning, C. H., T. Benjamins, et al. (2006). "The distribution of FSH receptor isoforms is related to basal FSH levels in subfertile women with normal menstrual cycles." Hum Reprod **21**(2): 443-6.

de Vet, A., J. S. Laven, et al. (2002). "Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging." Fertil Steril **77**(2): 357-62.

De Vries, M. J., P. De Sutter, et al. (1999). "Prognostic factors in patients continuing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection treatment and dropouts." Fertil Steril **72**(4): 674-8.

Drummond, A. E. (2006). "The role of steroids in follicular growth." Reprod Biol Endocrinol **4**: 16.

Drummond, A. E. and J. K. Findlay (1999). "The role of estrogen in folliculogenesis." Mol Cell Endocrinol **151**(1-2): 57-64.

Durlinger, A. L., P. Kramer, et al. (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." Endocrinology **140**(12): 5789-96.

Enskog, A., M. Henriksson, et al. (1999). "Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization." Fertil Steril **71**(5): 808-14.

Evers, J. (2002). "Female subfertility." Lancet **360**(9327): 151-59.

Faddy, M. J., R. G. Gosden, et al. (1992). "Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause." Hum Reprod **7**(10): 1342-6.

Fauser, B. C., P. Devroey, et al. (1999). "Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks." Hum Reprod **14**(11): 2681-6.

Fauser, B. C. and A. M. Van Heusden (1997). "Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences." Endocr Rev **18**(1): 71-106.

Ferraretti, A. P., A. La Marca, et al. (2011). "ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria." Hum Reprod **26**(7): 1616-24.

Garcia, J. E., G. S. Jones, et al. (1983). "Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981." Fertil Steril **39**(2): 174-9.

Gharib, S. D., M. E. Wierman, et al. (1990). "Molecular biology of the pituitary gonadotropins." Endocr Rev **11**(1): 177-99.

Gibbons, J. R., M. C. Wiltbank, et al. (1997). "Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers." Biol Reprod **57**(5): 1066-73.

Gleicher, N., A. Weghofer, et al. (2011). "Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging." Reprod Biol Endocrinol **9**: 23.

Gnoth, C., E. Godehardt, et al. (2005). "Definition and prevalence of subfertility and infertility." Hum Reprod **20**(5): 1144-7.

Gosden, R., J. Krapez, et al. (1997). "Growth and development of the mammalian oocyte." Bioessays **19**(10): 875-82.

Gosden, R. G. and M. Bownes (1995). "Cellular and molecular aspects of oocyte development." Grudzinskas, J.G., Yovich, J.L. (Eds.), Gametes-The Oocyte, Cambridge Reviews in Human Reproduction. Cambridge University Press, Cambridge: 23-53.

Gougeon, A. (1996). "Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses." Endocr Rev **17**(2): 121-55.

Gougeon, A., R. Ecochard, et al. (1994). "Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women." Biol Reprod **50**(3): 653-63.

Gromoll, J., M. Simoni, et al. (1996). "Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor." Mol Cell Endocrinol **125**(1-2): 177-82.

Groome, N. P., P. J. Illingworth, et al. (1996). "Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle." J Clin Endocrinol Metab **81**(4): 1401-5.

Guraya, S. S. (1998). "Cellular and Molecular Biology of Gonadal Development and Maturation in Mammals: Fundamentals and Biomedical Implications." Narosa Publishing House, New Delhi.

Gurgan, T., B. Urman, et al. (1997). "Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 to predict ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization using a flare-up protocol." Fertil Steril **68**(3): 483-7.

Haadsma, M. L., A. Bukman, et al. (2007). "The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population." Hum Reprod **22**(7): 1925-31.

HasanSheikhha, M., M. Eftekhari, et al. (2011). "Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation." J Hum Reprod Sci **4**: 86-90.

Heckert, L. L., I. J. Daley, et al. (1992). "Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene." Mol Endocrinol **6**(1): 70-80.

Hellberg, D., U. Waldenstrom, et al. (2004). "Defining a poor responder in in vitro fertilization." Fertil Steril **82**(2): 488-90.

Hendriks, D. J., E. R. te Velde, et al. (2008). "Expected poor ovarian response in predicting cumulative pregnancy rates: a powerful tool." Reprod Biomed Online **17**(5): 727-36.

Hickey, T. E., D. L. Marrocco, et al. (2005). "Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells." Biol Reprod **73**(4): 825-32.

Hutt, K. J., E. A. McLaughlin, et al. (2006). "KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth." Biol Reprod **75**(3): 421-33.

Jacobs, S. L., D. A. Metzger, et al. (1990). "Effect of age on response to human menopausal gonadotropin stimulation." J Clin Endocrinol Metab **71**(6): 1525-30.

Jayaprakasan, K., B. Campbell, et al. (2010). "A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation." Fertil Steril **93**(3): 855-64.

Jones, H. W., Jr. (2008). "The use of controlled ovarian hyperstimulation (COH) in clinical in vitro fertilization: the role of Georgeanna Seegar Jones." Fertil Steril **90**(5): e1-3.

Jun, J. K., J. S. Yoon, et al. (2006). "Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET." J Hum Genet **51**(8): 665-70.

Karande, V. and N. Gleicher (1999). "A rational approach to the management of low responders in in-vitro fertilization." Hum Reprod **14**(7): 1744-8.

Keay, S. D., N. H. Liversedge, et al. (1997). "Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation." Br J Obstet Gynaecol **104**(5): 521-7.

Keefe, D. L., T. Niven-Fairchild, et al. (1995). "Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women." Fertil Steril **64**(3): 577-83.

Knobil, E. (1980). "The neuroendocrine control of the menstrual cycle." Recent Prog Horm Res **36**: 53-88.

Kucuk, T., H. Kozinoglu, et al. (2008). "Growth hormone co-treatment within a GnRH agonist long protocol in patients with poor ovarian response: a prospective, randomized, clinical trial." J Assist Reprod Genet **25**(4): 123-7.

Kuijper, E. A., M. A. Blankenstein, et al. (2010). "Frequency distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity." Reprod Biomed Online **20**(5): 588-93.

La Marca, A., G. Sighinolfi, et al. (2010). "Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART)." Hum Reprod Update **16**(2): 113-30.

Laven, J. S., A. G. Mulders, et al. (2003). "Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility." Fertil Steril **80**(4): 986-92.

Leader, B., A. Hegde, et al. (2012). "High frequency of discordance between antimullerian hormone and follicle-stimulating hormone levels in serum from estradiol-confirmed days 2 to 4 of the menstrual cycle from 5,354 women in U.S. fertility centers." Fertil Steril.

Lesser, C. (1999). "Ovarian decline. In the later reproductive years." Adv Nurse Pract **7**(3): 36-8, 41, 43-4.

Licciardi, F. L., H. C. Liu, et al. (1995). "Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization." Fertil Steril **64**(5): 991-4.

Lim, A. S. and M. F. Tsakok (1997). "Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes?" Fertil Steril **68**(2): 265-71.

Liu, K. and A. Case (2011). "Advanced reproductive age and fertility." J Obstet Gynaecol Can **33**(11): 1165-75.

Livshyts, G., S. Podlesnaja, et al. (2009). "A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine." J Assist Reprod Genet **26**(1): 29-34.

Loutradis, D., A. Elsheikh, et al. (2004). "Results of controlled ovarian stimulation for ART in poor responders according to the short protocol using different gonadotrophins combinations." Arch Gynecol Obstet **270**(4): 223-6.

Loutradis, D., E. Patsoula, et al. (2006). "FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs." J Assist Reprod Genet **23**(4): 177-84.

Loutradis, D., C. Theofanakis, et al. (2012). "Genetic profile of SNP(s) and ovulation induction." Curr Pharm Biotechnol **13**(3): 417-25.

Loutradis, D., A. Vlismas, et al. (2008). "Pharmacogenetics in ovarian stimulation--current concepts." Ann N Y Acad Sci **1127**: 10-9.

Lucci, C. M., R. V. Silva, et al. (2001). "Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles." Small Rumin Res **41**(1): 61-69.

Lussiana, C., B. Guani, et al. (2008). "Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene: clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene." Obstet Gynecol Surv **63**(12): 785-95.

Macaluso, M., T. J. Wright-Schnapp, et al. (2008). "A public health focus on infertility prevention, detection, and management." Fertil Steril **93**(1): 16 e1-10.

McGee, E. A. and A. J. Hsueh (2000). "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles." Endocr Rev **21**(2): 200-14.

Melton, L. (2003). "Pharmacogenetics and genotyping: on the trail of SNPs." Nature **422**(6934): 917, 919, 921, 923.

Moenter, S. M., R. M. Brand, et al. (1992). "Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse." Endocrinology **130**(1): 503-10.

Mohiyiddeen, L., W. G. Newman, et al. (2012). "A common Asn680Ser polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is not associated with ovarian response to gonadotropin stimulation in patients undergoing in vitro fertilization." Fertil Steril.

Motta, P. M., S. A. Nottola, et al. (1995). "Ultrastructure of human reproduction from folliculogenesis to early embryo development. A review." Ital J Anat Embryol **100**(4): 9-72.

Nikolaou, D., S. Lavery, et al. (2002). "Is there a link between an extremely poor response to ovarian hyperstimulation and early ovarian failure?" Hum Reprod **17**(4): 1106-11.

Nuojua-Huttunen, S., C. Tomas, et al. (1999). "Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome." Hum Reprod **14**(3): 698-703.

Oudendijk, J. F., F. Yarde, et al. (2012). "The poor responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review." Hum Reprod Update **18**(1): 1-11.

Parrott, J. A. and M. K. Skinner (2000). "Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production." Mol Reprod Dev **55**(1): 55-64.

Perez Mayorga, M., J. Gromoll, et al. (2000). "Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3365-9.

Picton, H., D. Briggs, et al. (1998). "The molecular basis of oocyte growth and development." Mol Cell Endocrinol **145**(1-2): 27-37.

Poncelet, C. and C. Sifer (2011). Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain.

Popovic-Todorovic, B., A. Loft, et al. (2003). "A prospective randomized clinical trial comparing an individual dose of recombinant FSH based on predictive factors versus a 'standard' dose of 150 IU/day in 'standard' patients undergoing IVF/ICSI treatment." Hum Reprod **18**(11): 2275-82.

Ramalho-Santos, J. (2012). Meiose e Gametogênese. Biologia Celular e Molecular, 5ª edição C. Azevedo, Lidel: 417-35.

Ramalho-Santos, J., S. Varum, et al. (2009). "Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells." Hum Reprod Update **15**(5): 553-72.

Rankin, T. and J. Dean (2000). "The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat." Rev Reprod **5**(2): 114-21.

Richardson, S. J., V. Senikas, et al. (1987). "Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion." J Clin Endocrinol Metab **65**(6): 1231-7.

Rizk, B. (2006). "Ovarian Hyperstimulation Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Prevention and Management." Cambridge University Press, New York, USA.

Rizk, B. (2009). "Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Genetics of ovarian hyperstimulation syndrome." Reprod Biomed Online **19**(1): 14-27.

Rodien, P., I. Beau, et al. (2010). "Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) due to mutations in the follicle-stimulating hormone receptor." Ann Endocrinol (Paris) **71**(3): 206-9.

Rodini, G. P., V. K. Genro, et al. (2011). "There is no complete linkage between the polymorphisms N680S and T307A of the follicular stimulating hormone receptor gene in fertile women." J Assist Reprod Genet **28**(3): 221-4.

Rombauts, L., J. L. Onwude, et al. (2011). "The predictive value of antral follicle count remains unchanged across the menstrual cycle." Fertil Steril **96**(6): 1514-8.

Roupa, Z., M. Polikandrioti, et al. (2009). "Causes os Infertility in women at reproductive age." Health Science Journal **3**(2): 80-87.

Salesse, R., J. J. Remy, et al. (1991). "Towards understanding the glycoprotein hormone receptors." Biochimie **73**(1): 109-20.

Sanchez, F. and J. Smitz (2012). "Molecular control of oogenesis." Biochim Biophys Acta.

Sawyer, H. R., P. Smith, et al. (2002). "Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep." Biol Reprod **66**(4): 1134-50.

Seifer, D. B. and D. T. Maclaughlin (2007). "Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance." Fertil Steril **88**(3): 539-46.

Seshagiri, P. B. (2001). "Molecular insights into the causes of male infertility." J Biosci **26**(4 Suppl): 429-35.

Sharma, V., V. Allgar, et al. (2002). "Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility." Fertil Steril **78**(1): 40-6.

Sheikhha, M. H., M. Eftekhar, et al. (2011). "Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation." J Hum Reprod Sci **4**(2): 86-90.

Shoham, Z., A. Weissman, et al. (1994). "Intravenous albumin for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome in an in vitro fertilization program: a prospective, randomized, placebo-controlled study." Fertil Steril **62**(1): 137-42.

Shupnik, M. A. (1996). "Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes." Trends Endocrinol Metab **7**(8): 272-6.

Shupnik, M. A. (1996). "Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone." Biol Reprod **54**(2): 279-86.

Sills, E. S., M. M. Alper, et al. (2009). "Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **146**(1): 30-6.

Simoni, M., J. Gromoll, et al. (1999). "Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms." J Clin Endocrinol Metab **84**(2): 751-5.

Simoni, M., E. Nieschlag, et al. (2002). "Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction." Hum Reprod Update **8**(5): 413-21.

Simoni, M., C. B. Tempfer, et al. (2008). "Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response." Hum Reprod Update **14**(5): 459-84.

Snow, J. M. (1996). Hormonal Control of the Female Monthly Cycle.

Sudo, S., M. Kudo, et al. (2002). "Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene." Mol Hum Reprod **8**(10): 893-9.

Tinkanen, H., M. Blauer, et al. (1999). "Prognostic factors in controlled ovarian hyperstimulation." Fertil Steril **72**(5): 932-6.

Urman, B., S. M. Pride, et al. (1992). "Management of overstimulated gonadotrophin cycles with a controlled drift period." Hum Reprod **7**(2): 213-7.

van den Hurk, R. and J. Zhao (2005). "Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles." Theriogenology **63**(6): 1717-51.

van Rooij, I. A., F. J. Broekmans, et al. (2005). "Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study." Fertil Steril **83**(4): 979-87.

van Santbrink, E. J., W. C. Hop, et al. (1995). "Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle." Fertil Steril **64**(1): 37-43.

van Zonneveld, P., G. J. Scheffer, et al. (2003). "Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women." Hum Reprod **18**(3): 495-501.

Vander, A. J., J. H. Sherman, et al. (1990). Human Physiology. 5th ed. .

Verlinsky, Y., N. Ginsberg, et al. (1990). "Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis." Hum Reprod **5**(7): 826-9.

Visser, J. A., F. H. de Jong, et al. (2006). "Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function." Reproduction **131**(1): 1-9.

Vollman, R. F. (1977). "The menstrual cycle." Major Probl Obstet Gynecol **7**: 1-193.

Voorhis, B. (2007). "Clinical practice. In vitro fertilization." N Engl J Med **356**(4): 379-86.

Weenen, C., J. S. Laven, et al. (2004). "Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment." Mol Hum Reprod **10**(2): 77-83.

Welt, C. K., K. A. Martin, et al. (1997). "Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women." J Clin Endocrinol Metab **82**(8): 2645-52.

Welt, C. K., Y. L. Pagan, et al. (2003). "Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and the inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition." J Clin Endocrinol Metab **88**(4): 1766-71.

Wierman, M. E. (2007). "Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action." Adv Physiol Educ **31**(1): 26-33.

Williams, W. P., 3rd and L. J. Kriegsfeld (2012). "Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 60.

Wuttke, W., H. Jarry, et al. (1996). "The neurochemistry of the GnRH pulse generator." Acta Neurobiol Exp (Wars) **56**(3): 707-13.

Yao, Y., M. Cai-hong, et al. (2011). "Influence of follicle-stimulating hormone receptor (*FSHR*) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome: A meta-analysis." Mol. Genet. Metab. **103**: 388-393.

Zambrano, E., T. Zarinan, et al. (1999). "Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants." Endocrine **10**(2): 113-21.